



Facultad de Química, Bioquímica y Farmacia  
Universidad Nacional de San Luis

## **TESIS DOCTORAL EN BIOQUÍMICA**

# **“MECANISMO ANTI-INFLAMATORIO DE LA NITRONA 5,5-DIMETIL-1-PIRROLINA *N*-OXIDO: ÉNFASIS EN LA INFLAMACIÓN DEL TEJIDO ADIPOSO OBESO”**

**Tesista: Lic. Marcos David Muñoz**

**Director: Dr. Darío Ceferino Ramírez**

**Co-director: Dr. Sergio Eduardo Álvarez**



Consejo Nacional de Investigaciones Científicas y Técnicas Instituto Multidisciplinario de Investigación Biológica  
San Luis



## ABSTRACT

Obesity is a chronic low-grade inflammatory diseases, in which adipose tissue is metabolically stressed by hypoxia, free fatty acids, reactive oxygen species and pro-inflammatory macrophages infiltration. Preliminary studies have shown that nitron spin trap 5,5-dimethyl-1-pyrroline *N*-oxide (DMPO) possess anti-inflammatory effects in a model of lipopolysaccharide (LPS)-primed RAW 264.7 cell line, however the mechanisms by which DMPO exerts its effects remain unknown. Taking this into account we propose that DMPO has long-term effects on macrophage transcriptome that prevents macrophage switch towards an inflammatory phenotype induced by LPS; and also short-term effects related to interference of TLR signaling pathways in early stages of LPS-induced activation. To test this hypothesis we performed a transcriptomic analysis using microarray technology together with bioinformatics tools and functional genomics in 3 different experimental models: *in vitro*, *in silico* and *in vivo*. Results obtained indicated that DMPO by itself has effects related to negative regulation of immune system on the transcriptome of macrophages by acting upon several TLRs receptors and IRFs transcription factors. Moreover, DMPO was able to inhibit 161 genes related to immune system and inflammatory response in the transcriptome of LPS-primed macrophages, these changes were confirmed using nCounter technology, ELISA and western-blot techniques. Later we performed docking simulations to determine the interaction between DMPO and TLR's TIR domain. Results showed that DMPO binds to a region necessary for signal transduction called BB-loop, which would interfere TLR signaling thus explaining DMPO short-term anti-inflammatory effects. Finally, we used an experimental inflammatory model of mice with metabolic syndrome instilled with LPS to test the effects of DMPO *in vivo*, results showed that the spin trap was able to reduce inflammation markers on serum and adipose tissue demonstrating that anti-inflammatory effects of DMPO can be extrapolated to *in vivo* models. Herein, we determined some of the possible mechanisms by which the nitron spin trap DMPO inhibits LPS-induced inflammatory activation in macrophages, making of this information a significant contribution to the development of nitron-based anti-inflammatory drugs.

## RESÚMEN

La obesidad es una enfermedad inflamatoria crónica de bajo grado en la cual el tejido adiposo se encuentra metabólicamente estresado por un aumento en las especies reactivas del oxígeno, ácidos grasos libres, hipoxia e infiltración de macrófagos pro-inflamatorios. Estudios preliminares indican que el espin trap de tipo nitrona 5,5-dimetil-1-pirrolina *N*-óxido (DMPO) tiene efectos anti-inflamatorios en células RAW 264.7 inducidas por LPS, pero los mecanismos por los cuales DMPO ejerce sus efectos permanecen desconocidos. En base a esto propusimos que DMPO posee efectos a largo plazo en el transcriptoma de macrófagos que previenen el cambio fenotípico pro-inflamatorio producido por LPS y efectos a corto plazo relacionados a la interferencia en el señalamiento del receptor de LPS, TLR-4. Para poner a prueba la hipótesis se realizó un estudio transcriptómico utilizando la tecnología de microarreglos junto a herramientas bioinformáticas y genómica funcional en modelos experimentales *in vitro*, *in silico* e *in vivo*. Los resultados obtenidos indicaron que DMPO por sí solo posee efectos en el transcriptoma de macrófagos relacionados a la regulación negativa del sistema inmune actuando sobre diferentes receptores TLRs y factores de transcripción IRFs. Por otro lado, el espin trap tuvo efectos inhibidores de la transcripción en 161 genes relacionados a la respuesta inflamatoria y al sistema inmune en células estimuladas con LPS. Los cambios observados fueron confirmados utilizando tecnología nCounter, técnicas de ELISA y western-blot. Luego, determinamos la interacción de DMPO con el dominio TIR del receptor TLR utilizando simulaciones *in silico*, a partir de las cuales se determinó que DMPO interaccionaría con la región BB-loop responsable de la transducción de la señal indicando un posible mecanismo del efecto anti-inflamatorio. Por último, por medio de la utilización de un modelo animal de ratones con síndrome metabólico instilados con LPS se determinó que los efectos anti-inflamatorios de DMPO son extrapolables al modelo *in vivo*. En la presente tesis se determinaron posibles mecanismos por los cuales la nitrona DMPO inhibe la activación inflamatoria de los macrófagos por LPS, haciendo un gran aporte para la utilización de derivados de espin-traps como una plataforma estructural en el diseño de nuevos fármacos anti-inflamatorios basados en su mecanismo de acción.

**A mi abuelo Julián...un buen tipo.**

**“Los planetas giran sin saberlo, así como tu recuerdo vibra en ellos”**

**Luis Alberto Spinetta.**

## **AGRADECIMIENTOS**

- **A la Universidad Nacional de San Luis (UNSL)**
- **Al Consejo Nacional de Investigaciones Científica y Técnicas (CONICET)**
- **Al Instituto Multidisciplinario de Investigaciones Biológicas-San Luis (IMIBIO)**
- **A mi director Dr. Darío Ramírez por haber confiado en mí al ofrecerme completa libertad en esta investigación**
- **A mi co-director Dr. Sergio Álvarez por su ayuda y asistencia**
- **A Sandra Gomez-Mejiba y Zili Zhai por su gran aporte en la presente tesis**
- **A mi excelente compañera Cecilia, con quien compartí 5 años de trabajo y de quien aprendí mucho**
- **A mis compañeros Martín, María José, Ernesto y Cesar**
- **A Ludmila, Yamila y Melina por haberme asistido cada vez que lo necesité**
- **Al Dr. Daniel Enriz y Lucas Gutiérrez por su colaboración interdisciplinaria**
- **Al grupo de trabajo del Dr. Mason: María Kadiska, Douglas Ganini Da Silva y Bushel Pierre por haberme recibido en su laboratorio amablemente**
- **A mis amigos Fernando, Federica , Malena, Gera, Carla, Lisa, Ignacio, Facu y Enzo por estar conmigo siempre a lo largo de los años**
- **A Los Elefantes Efervescentes**
- **A mi familia, quienes apoyan todas las etapas y todos los aspectos de mi vida**

## *Índice*

|   |           |
|---|-----------|
| <b>Glosario y abreviaturas</b>  | <b>10</b> |
| <b>Prólogo</b>  | <b>14</b> |
| <b>Introducción</b>   | <b>16</b> |
| 1) Obesidad y sus anormalidades metabólicas asociadas   | 17        |
| 2) Síndrome metabólico y resistencia insulínica como consecuencias de la inflamación del tejido adiposo en obesidad | 18        |
| 3) El tejido adiposo y su rol en el organismo   | 21        |
| 4) Infiltración de macrófagos en el tejido adiposo en obesidad  | 22        |
| 5) Macrófagos pro inflamatorios (tipo M1) y señalamiento por receptores tipo <i>Toll</i>                            | 24        |
| 6) Causas y mecanismos de la inflamación del tejido adiposo   | 27        |
| 7) Espin traps, su desarrollo para el estudio de radicales libres y sus efectos anti-inflamatorios                  | 28        |
| <b>Hipótesis y Objetivos</b>  | <b>33</b> |
| <b>Materiales y Métodos</b>   | <b>36</b> |
| 1) Cultivo Celular  | 37        |
| 2) Tratamiento con DMPO y LPS   | 37        |
| 3) Determinación indirecta de la producción de ON   | 37        |
| 4) Ensayo de determinación de la producción de superóxido con dihidroetidio (DHE)                                   | 37        |
| 5) Simulación de Docking  | 38        |



|   |           |
|---|-----------|
| 6) Dinámica Molecular   | 38        |
| 7) Extracción de ARN para microarreglos y nCounter  | 38        |
| 8) Análisis bioinformático de los datos de microarray   | 39        |
| 9) Determinación de IFN-beta por ELISA  | 39        |
| 10) Análisis semi-cuantitativo de los niveles del ARNm de IRF7 por RT-PCR   | 40        |
| 11) Análisis de los lisados celulares por la técnica de western-blot  | 40        |
| 12) Preparación de lisados celulares  | 40        |
| 13) Análisis de los lisados celulares por la técnica de western-blot  | 40        |
| 14) Modelo experimental de síndrome metabólico  | 41        |
| 15) Composición de las dietas   | 42        |
| 16) Test de Tolerancia a la Glucosa   | 42        |
| 17) Obtención de muestras de tejido   | 42        |
| 18) Preparación de homogenato de tejido   | 42        |
| 19) Obtención de muestras de sangre y suero   | 42        |
| 20) Determinación de la concentración de TNF- $\alpha$  | 42        |
| 21) Determinación de la oxidación de proteínas  | 43        |
| 22) Determinación de Nitrotirosina  | 44        |
| <b>Resultados</b>   | <b>45</b> |
| 1. Estudio de los efectos de DMPO sobre la activación inflamatoria de los macrófagos estimulados con LPS a corto plazo. |           |
| a. Estudio <i>in vitro</i> de los efectos de DMPO sobre la producción de NO y anión superóxido ( $O_2^-$ )              | 46        |

|   |           |
|---|-----------|
| b. Estudio <i>in silico</i> de la interacción de DMPO<br>con el dominio TIR del receptor Toll-2 (TLR-2)                                     | 48        |
| 2. Estudio de los efectos a largo plazo de DMPO y LPS sobre el perfil de<br>activación de macrófagos murinos.                               |           |
| 1. Estudio transcriptómico:   | 51        |
| a. Estudio de los efectos de DMPO sobre el<br>transcriptoma de macrófagos en reposo   | 53        |
| b. Estudio de los efectos de LPS sobre el<br>transcriptoma de macrófagos  | 59        |
| c. Estudio de los efectos de DMPO sobre el<br>transcriptoma de macrófagos estimulados con LPS   | 65        |
| 2. Confirmación de los datos obtenidos en el análisis<br>bioinformático de los datos de microarray  | 72        |
| 3. Estudio de los efectos anti-inflamatorios de DMPO in-vivo en un<br>modelo de instilación intratraqueal a ratones con síndrome metabólico | 77        |
| <b>Discusión</b>  | <b>83</b> |
| <b>Conclusiones</b>   | <b>88</b> |
| <b>Anexo I: Figura suplementaria</b>  | <b>90</b> |
| <b>Bibliografía</b>   | <b>91</b> |

## **GLOSARIO Y ABREVIATURAS**

**AGL:** ácidos grasos libres

**AGMI:** ácidos grasos monoinsaturados

**AGPI:** ácidos grasos poliinsaturados

**ARN:** ácido ribonucleico

**ARNm:** ácido ribonucleico mensajero

**ASCH:** L-ascorbato

**CCL:** citocina de tipo C-C

**CCR2:** Receptor de citocinas de motivo C-C tipo 2

**CD40:** Grupo de designación número 40

**CLS:** Estructuras de tipo corona

**COX-2:** ciclooxigenasa tipo 2

**CXCR1:** Receptor de citocinas de motivo C-X-C tipo 1

**DAMP:** Patrones moleculares asociados a peligro

**DEGs:** Genes de expresión diferenciada

**DMPO:** 5-5, dimetil-1-pirrolina-*N*-óxido

**DMT2:** diabetes mellitus tipo 2

**ECV:** enfermedad cardiovascular

**EROs:** Especies reactivas del oxígeno

**ERNs:** Especies reactivas del nitrógeno

**ESR:** resonancia de spin electrónico

**GAPDH:** gliceraldehído 3-fosfato deshidrogenasa

**GLUT:** transportador de glucosa

**GO:** Ontología del gen

**GR1:** Marcador de granulocitos 1

**GSH:** glutatión reducido

**GSSG:** glutatión oxidado

**GST:** Glutation-S-transferasa

**HDL:** lipoproteína de alta densidad

**HE:** hematoxilina eosina

**HFD:** dieta rica en grasa

**HIF-1:** Factor inducible de hipoxia tipo 1

**HO-1:** hemoxigenasa tipo-1

**IDF:** Federación internacional de diabetes

**IFN:** interferón

**IKK $\beta$ :** quinasa inhibidora de NF- $\kappa$ B

**IL:** interleucina

**IMC:** índice de masa corporal

**iNOS:** óxido nítrico sintasa inducible

**IPA:** *Ingenuity Pathway Analysis* software

**IRF:** Factor de respuesta al interferón

**IRS:** Sustrato del receptor de insulina

**JNK:** c-Jun NH(2) quinasa terminal

**KEGG:** Enciclopedia genómica de Kyoto

**LB:** buffer de siembra

**LDL:** lipoproteína de baja densidad

**LFD:** dieta baja en grasa

**LPS:** lipopolisacárido

**Ly6C:** Antígeno de linfocitos complejo 6 tipo C

**LRR:** Dominio rico en leucinas

**MCP-1 o CCL2:** Proteína quimiotáctica de monocitos

**MMPBSA:** *Molecular Mechanics Poisson Boltzmann Surface Area*

**MyD88:** Proteína de diferenciación mieloide y respuesta primaria gen 88

**NCEP-ATP III:** National Cholesterol Education Program Adult Treatment Panel III

**NF- $\kappa$ B:** Factor nuclear  $\kappa$ B

**NF $\kappa$ Biz:** Inhibidor Zeta del NF- $\kappa$ B

**NOX-2:** nicotinamida adenina dinucleótido fosfato oxidasa

**OMS:** Organización mundial de la salud

**ON:** óxido nítrico

**PA:** presión arterial

**PAMP:** Patrones moleculares asociados a patógenos

**PBN:** *N-tert*-butil- $\alpha$ -fenilnitrona

**PCA:** Análisis de componentes principales

**PI3K:** fosfatidilinositol 3-quinasa

**PIP3:** fosfatidilinositol-3, 4,5- trifosfato

**PKB/Akt:** proteína quinasa B

**PRR:** receptor de reconocimiento de patrón de activación

**PPAR- $\delta$ :** receptor delta activado por el proliferador de peroxisomas

**QTAIM:** *Theory Quantum Atoms in Molecules calculation*

**RE:** retículo endoplasmático

**RMSD:** desviación media cuadrática

**RI:** resistencia a la insulina

**SM:** síndrome metabólico

**TIR:** Dominio de homología al receptor Toll/ interleucina-1

**TG:** triglicéridos

**TGF- $\beta$ :** factor de crecimiento transformante beta

**TLRs:** Receptores tipo *Toll*

**TNF- $\alpha$ :** Factor de necrosis tumoral alfa

**TRAM:** Molécula adaptadora tipo 2 del receptor Toll

**TRIF:** Adaptador inductor de IFN- $\beta$  que contiene dominio TIR

**WB:** western blot

## PRÓLOGO

La obesidad y el sobrepeso son enfermedades muy complejas, altamente prevalente en nuestra sociedad, económicamente muy caras y a la vez muy serias debido a sus anormalidades metabólicas asociadas. La obesidad es una enfermedad inflamatoria crónica en la cual inflamación del tejido adiposo es un componente central. Esta inflamación ocurre debido a la activación inflamatoria de los macrófagos por diversos factores asociados al microambiente del tejido adiposo metabólicamente irritado en la obesidad. Por lo tanto, nuevas estrategias destinadas a disminuir la activación inflamatoria de estas células del sistema inmune innato es de suma importancia en el desarrollo de nuevas drogas. Los espin traps fueron sintetizados como herramientas con el propósito de atrapar y estabilizar radicales libres facilitando de esta manera su estudio. En los últimos años nuestro laboratorio se ha destacado mundialmente por sus aportes que indican que estas moléculas tienen un efecto inhibidor de la activación de los macrófagos por la endotoxina bacteriana, lipopolisacárido (LPS). Esta información es usada en este trabajo para estudiar los mecanismos moleculares mediante los cuales un espin trap inhibe la activación inflamatoria de los macrófagos. Esta información esperamos pueda ser usada para el diseño de drogas novedosas basadas en un mecanismo de acción claro para reducir efectos adversos. La generación de drogas anti-inflamatorias más seguras basadas en mecanismos moleculares claros es un campo emergente, y cada vez más amplio debido a la gran cantidad de afecciones relacionadas a situaciones inflamatorias entre las que se encuentran el cáncer, y las enfermedades cardiovasculares, neurodegenerativas, autoinmunes y metabólicas, como la obesidad. Esta información indica que en un futuro sería posible la síntesis química de compuestos derivados de estos compuestos para inhibir la activación inflamatoria de los macrófagos, y de esta forma reducir la inflamación del tejido adiposo en obesidad, y por lo tanto reducir el riesgo de enfermedades inflamatorias asociadas a la obesidad y el sobrepeso.

La presente tesis tiene la particularidad de ser la primera en la Universidad Nacional de San Luis en implementar herramientas bioinformáticas para el análisis de datos transcriptómicos. En este caso, la bioinformática aplicada fue utilizada para determinar a nivel global los cambios en el transcriptoma de macrófagos expuestos al espin trap 5,5-dimetil-1-pirrolina *N*-óxido (DMPO) con el objeto de determinar los mecanismos por los

cuales esta vieja molécula ejerce sus nuevos efectos. El enfoque utilizado no apunta a un gen en particular sino, a funciones celulares y vías de señalamiento enriquecidas.

Para un químico orgánico, la característica más interesante del espin trap es la capacidad de generar un nuevo enlace covalente entre un espin trap y un radical libre en una reacción específica del radical formado. Para un inmunólogo, lo más interesante de la reacción entre un espin trap y un radical libre es la creación de un nuevo epítipo factible de ser reconocido por el sistema inmune permitiendo su localización. Para un bioquímico, esta reacción es una manera novedosa de identificar blancos proteicos de oxidación generados en estados de estrés para contribuir a la comprensión de las bases químicas de procesos radicalarios en escenarios biológicos. Para un biólogo molecular, la reacción del espin trap con una macromolécula radicalizada es secundaria debido a que los efectos biológicos observados no pueden ser explicados por su capacidad de espin trap, más bien pueden ser explicados por alteraciones en el flujo de la información biológica causadas por interacciones moleculares en vías de señalamiento.





---

# INTRODUCCIÓN

---



## INTRODUCCIÓN

### 1.1. Obesidad y sus anormalidades metabólicas asociadas

La Obesidad es una enfermedad inflamatoria de curso crónico. Esta enfermedad ocurre debido a un balance energético positivo que consiste en un exceso en la cantidad de energía consumida con respecto a la cantidad de energía gastada como resultado de la interacción entre factores nutricionales, genéticos, ambientales y socio-económicos [1, 2]. Obesidad es un factor de riesgo para un número de otras enfermedades clasificadas como enfermedades metabólicas asociadas [3], entre las que se incluyen diabetes tipo 2, enfermedades cardiovasculares, neurológicas, inmunológicas, asma, osteoartritis y algunos tipos de cáncer [4].

La obesidad es en una enfermedad compleja, que junto con el sobrepeso afecta a más de un tercio de la población mundial [5]. La prevalencia de sobrepeso y obesidad ha aumentado a un ritmo alarmante a nivel mundial de manera que si continúa esta tendencia, para el año 2030 se estima que el 38% de la población adulta tendrá sobrepeso y un 20% será obeso [6]. La prevalencia actual de la obesidad tiene su causa en parte debido al hecho de que la evolución biológica tiene tiempos más extensos que la evolución cultural [2]. El organismo del ser humano actual es el mismo que el de los antepasados de hace miles de años, pero las costumbres y estilos de vida cambian rápidamente. Antepasados debían buscar su alimento mediante la caza, la pesca y/o recolección de frutos en condiciones ambientales y climáticas adversas. Con el paso del tiempo, la disponibilidad de alimentos fue cada vez mayor reduciendo al mínimo el esfuerzo físico, favoreciendo el estado de balance energético positivo [2].

Actualmente, la alimentación occidental, también llamada dieta americana estándar se caracteriza por consumir alimentos procesados con un alto contenido en grasas, postres y bebidas ricas en azúcar, así como el consumo elevado de carnes rojas y productos lácteos abundantes en grasas. Los alimentos procesados y refinados tienen un alto contenido en grasas saturadas, ácidos grasos *trans*, sacarosa y fructosa, proteínas de origen animal y sodio. A su vez tienen bajo contenido en grasas monoinsaturadas (AGMI) y ácidos grasos poliinsaturados (AGPI), proteínas de origen vegetal y fibra [7], constituyendo una dieta no saludable que favorece la obesidad [7, 8].

La organización mundial de la salud (OMS) y el centro para el control de las enfermedades (CDC) han clasificado a los adultos y niños de acuerdo a su índice de masa corporal ( $IMC = Kg/m^2$ ) en peso normal ( $IMC < 25$ ), sobrepeso ( $IMC > 25$  y  $< 30$ ) y obesos ( $IMC > 30$ ) [1]. Sin embargo, algunos pacientes con un IMC normal pueden estar en riesgo de los efectos de la inflamación del tejido adiposo y enfermedades cardiovasculares [9]. Esta discrepancia se debe a que entre los diversos depósitos de grasa, la acumulación de grasa alrededor de los órganos o grasa visceral es una de las más nocivas [10-13].

### **1.2. Síndrome metabólico y resistencia insulínica como consecuencias de la inflamación del tejido adiposo en obesidad**

Se denomina síndrome metabólico (SM) al conjunto de alteraciones metabólicas constituido por obesidad central, disminución de la concentración de lipoproteínas de alta densidad (HDL- c), elevación de las concentraciones de triglicéridos (TG), aumento de la presión arterial e hiperglucemia [14]. El SM se está convirtiendo en uno de los principales problemas de salud pública del siglo XXI, ya que se encuentra asociado a un incremento de 5 veces en la prevalencia de diabetes mellitus tipo 2 (DMT2) y de 2-3 veces en el incremento de las enfermedades cardiovasculares (ECV) [14, 15].

En el año 2009, se volvió a plantear la definición teniendo en cuenta las dos definiciones más ampliamente empleadas; la Federación internacional de diabetes (IDF) y el Programa Nacional de Educación sobre el Colesterol a través del Panel de expertos sobre Detección, Evaluación y Tratamiento de la Hipercolesterolemia (NCEP-ATP III). Se define SM con tres de los cinco criterios, utilizando un solo punto de corte para todos los criterios, excepto para el de la cintura, donde se recomienda utilizar los puntos de corte de la IDF para no europeos y los puntos de corte de IDF o NCEP-ATP III para personas de origen europeo, hasta que haya más información disponible [16]. Se define SM si se cumplen tres o más de las siguientes variables [17]: A) Trigliceridemia  $\geq 97$  mg/dl; HDL c-:  $< 50$  mg/dl (para niños entre 15-17 años  $< 45$  mg/dl); B) Glucemia en ayunas  $\geq 110$  mg/dl; percentil 75 por edad y sexo; C) Presión arterial sistólica o diastólica (mmHg)  $>$  percentil 90 para la edad, sexo y altura.

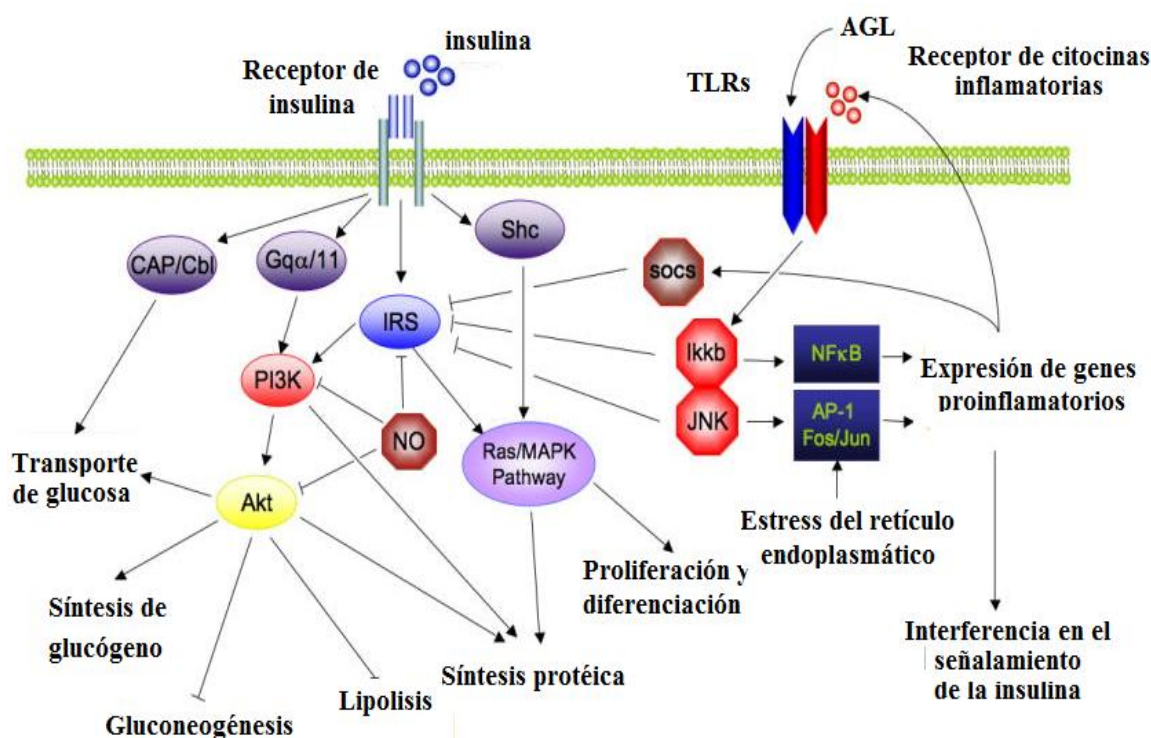
Es de destacar que aunque ninguna de las guías de diagnóstico lo incluye entre sus criterios, actualmente se acepta que en el SM existe un estado pro-inflamatorio, pro-oxidante y pro-trombótico. Además, como se ha dicho antes, no se trata de una única enfermedad, sino de una asociación de problemas de salud, de aparición simultánea o secuencial en un mismo individuo, causados por una combinación de factores genéticos y ambientales asociados a un determinado estilo de vida.

La hiperglucemia comprendida entre los síntomas del SM está relacionada estrechamente con la resistencia insulínica (RI) [18]. La insulina es una hormona anabólica secretada por las células  $\beta$  del páncreas en respuesta a diversos estímulos, siendo la glucosa el más relevante. Su principal función es mantener la homeostasis glucémica y de otros sustratos energéticos [19]. De esta forma, posterior a cada comida, la insulina suprime la liberación de ácidos grasos libres (AGL), mientras que favorece la síntesis de TG, en el tejido adiposo. Por otra parte, la insulina inhibe la producción hepática de glucosa, mientras que promueve la captación de glucosa por el tejido muscular esquelético, hígado y tejido adiposo. En un estado de RI, la acción de insulina a nivel celular está reducida, lo que aumenta la secreción de esta hormona. Esto permite compensar el defecto en su acción tisular y así mantener la homeostasis glucémica. Este fenómeno da cuenta del estado hiperinsulinémico, el cual es característico en sujetos con SM, particularmente después de una comida rica en carbohidratos [20].

En respuesta a la hiperglucemia relativa, las células  $\beta$ -pancreáticas expresan y secretan más insulina. Esta secreción de insulina aumenta la captación de glucosa por el músculo esquelético e inhibe la producción de glucosa hepática para mantener la normoglucemia. Así, los individuos con RI mantienen la normoglucemia a través de la sobreproducción y secreción de niveles elevados de insulina. Si la RI y la hipersecreción de se mantienen; a largo plazo podrían conducir a la insuficiencia de las células  $\beta$ -pancreáticas. La situación antes planteada que deriva inicialmente en prediabetes e intolerancia a la glucosa, puede conducir posteriormente a una hiperglucemia y desencadenar una diabetes tipo 2 [21].

El aumento de citoquinas proinflamatorias causado por el estrés metabólico/inflamatorio del tejido adiposo obeso induce RI debido a que la unión de mediadores

inflamatorios a receptores de la membrana celular, desencadena la migración del factor de transcripción NF $\kappa$ B desde el citosol al núcleo a través de la fosforilación de la proteína inhibidora de NF- $\kappa$ B (IKK) para la síntesis de nuevos mediadores inflamatorios [22]. La activación de la proteína IKK también tienen como consecuencia la fosforilación del sustrato del receptor de insulina 1 (IRS1) en residuos de serina lo que concluye en la interferencia de la transducción de la señal de la insulina. Como consecuencia, hay una menor translocación del transportador GLUT4, desde el citosol a la membrana celular, disminuyendo así la captación de la glucosa sanguínea [22]. Como respuesta compensatoria, ocurre una hipersecreción de insulina, lo cual explica la típica hiperinsulinemia de los individuos con RI (Fig. 1) [20].



**Figura 1: Mecanismos moleculares de la resistencia a la insulina.** Se observan múltiples vías de señalamiento que participan de la interferencia de la señal del IRS como IKKb como consecuencia del estímulo de citocinas inflamatorias y AGL. Además se observan los procesos metabólicos favorecidos (flechas en punta) y los procesos inhibidos (flechas sin punta). Traducido de [22].

El hecho de que los macrófagos en el tejido adiposo son protagonistas de la secreción de moléculas inflamatorias en obesidad, y que estas sean centrales en el desarrollo del síndrome metabólico y resistencia insulínica, colocó a la activación inflamatoria de macrófagos como principal blanco en el desarrollo de fármacos para el tratamiento de enfermedades metabólicas asociadas a obesidad.

### **1.3. El tejido adiposo y su rol en el organismo**

El tejido adiposo tiene la función de almacenar el excedente energético producto del balance positivo entre la cantidad de energía consumida con respecto a la cantidad gastada. Sin embargo, posee otras funciones como la de sostén mecánico y órgano endócrino [23].

El tejido adiposo es el único en edad adulta capaz de sufrir un importante cambio en su tamaño. La masa grasa puede oscilar entre un 2-3% del peso corporal en atletas muy bien entrenados y hasta un 60-70% en sujetos con obesidad mórbida. En sujetos de peso normal, el tejido adiposo recibe 0,2-0,6 litros de sangre por minuto, que corresponde al 3-7% del volumen circulante, mientras que en individuos con obesidad mórbida puede alcanzar entre el 15-30%.

El tejido adiposo se compone de adipocitos, pre-adipocitos, fibroblastos, células madre y células inmunitarias como macrófagos y linfocitos T [23]. Este secreta numerosos péptidos bioactivos conocidos colectivamente como adipoquinas. Dentro de estas se incluyen la leptina, adiponectina, resistina y quimiocinas como la proteína quimiotáctica de monocitos (CCL2) e interleucina-8 (IL-8). El tejido adiposo también secreta citoquinas proinflamatorias, tales como: interleucina-6 (IL-6), interleucina-1 (IL-1), TNF- $\alpha$  y citocinas anti-inflamatorias como IL-10 y el factor de crecimiento transformante beta (TGF- $\beta$ ) [24]. Por lo tanto, el tejido adiposo es un órgano endócrino, con gran dinámica en la regulación energética, homeostasis de la glucosa, regulación de la presión arterial y función inmune [23, 25, 26].

En un estado de balance energético positivo, el tejido adiposo se expande para almacenar el exceso de triglicéridos. La remodelación del tejido adiposo a través de la degradación de la matriz extracelular (ECM) y la adipogénesis son procesos claves en esta

expansión. Las metaloproteinasas y los inhibidores tisulares de metaloproteinasas de matriz juegan un papel importante en la degradación de ECM y en la remodelación del tejido adiposo [27]. La expansión del tejido adiposo como consecuencia de la desregulación de cualquiera de los factores anteriores pueden conducir a lesiones de los adipocitos e inflamación del tejido adiposo [28].

#### 1.4. Infiltración de macrófagos en el tejido adiposo en obesidad

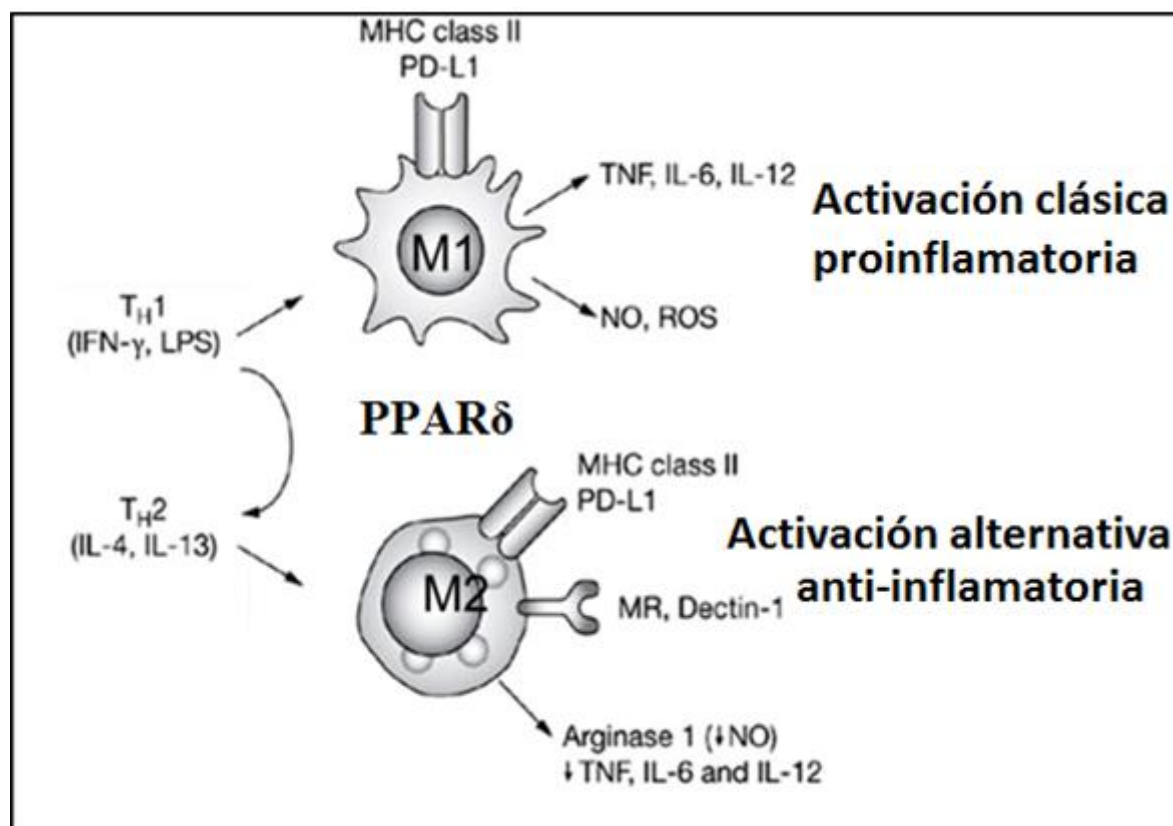
Normalmente, cuando la capacidad de acumulación de TG en el tejido graso subcutáneo ha sido saturada, la acumulación continúa con el depósito de grasa visceral (**Fig. 2**) y en otros tejidos tales como el músculo cardíaco, tejido hepático y musculo esquelético. En un individuo sano aproximadamente el 85% de la masa total de tejido adiposo es subcutáneo (periférico), mientras que el 15% restante pertenece a tejido adiposo visceral [26].



**Figura 2: Patrones de distribución de la grasa corporal.** Grasa periférica o subcutánea se refiere a la acumulación de grasa en los brazos, pecho, muslo y glúteos. Grasa visceral se refiere al depósito de grasa entre órganos (intestino, estómago, hígado y páncreas). Se observan cortes histológicos donde los puntos azules corresponden a macrófagos infiltrados entre los adipocitos del tejido adiposo (zonas no teñidas). En ambos tejidos adiposos existen

diferencias en cuanto a su capacidad de movilización de ácidos grasos, sensibilidad a los efectos de insulina y secreción de adipocinas.

En el tejido adiposo sano de la grasa periférica se encuentran normalmente, al igual que otros tejidos, infiltrado por macrófagos de tipo no-inflamatorio (clase M2). Estos provienen de monocitos circulantes que en ratón poseen el fenotipo  $\text{Gr1}^-/\text{Ly6C}^{\text{low}}\text{CCR2}^-/\text{CX3CR1}^{\text{high}}$ , son denominados “monocitos patrulleros” debido a que su función es vigilar el endotelio de vasos sanguíneos y contribuir a la formación de macrófagos activados alternativamente (clase M2) [29, 30]. Los macrófagos tipo M2 vigilan el tejido, remueven células dañadas y sus restos [31], producen citocinas anti-inflamatorias, utilizan L-arginina mediante la vía de la arginasa-1 y expresan el factor de transcripción PPAR  $\delta$  (receptor delta activado por el proliferador de peroxisomas) junto a la proteína hemo-oxigenasa -1 (HO-1) (Fig. 3) [32].



**Figura 3: Los macrófagos inflamatorios tipo-M1 producen inflamación del tejido adiposo.** Esquema que muestra aspectos diferenciales de los macrófagos antiinflamatorios o tipo-M2 y los macrófagos inflamatorios tipo-M1. Observe que los macrófagos tipo-M2 son



normales en el tejido adiposo. En obesidad ocurre un cambio de estos a un fenotipo M1 los cuales causan estrés oxidativo e inflamación en el tejido adiposo.

Por otro lado, ha sido demostrado que el tejido adiposo de la grasa visceral tiene mayor tendencia a ser infiltrada con macrófagos de tipo inflamatorio “M1” [33-35]. Estos macrófagos provienen de monocitos circulantes que en ratón poseen el fenotipo  $Gr1^{+}/Ly6C^{high}CCR2^{+}CX3CR1^{low}$ , expresan el factor de transcripción nuclear kappa B (NF- $\kappa$ B), sintetizan elevadas cantidades de especies reactivas del oxígeno (EROS), TNF- $\alpha$ , IL-6 e IL-1 $\beta$  y usan L-arginina mediante la vía de la óxido nítrico sintetasa inducible (iNOS) para sintetizar óxido nítrico (ON) [36, 37]. (**Fig. 3**).

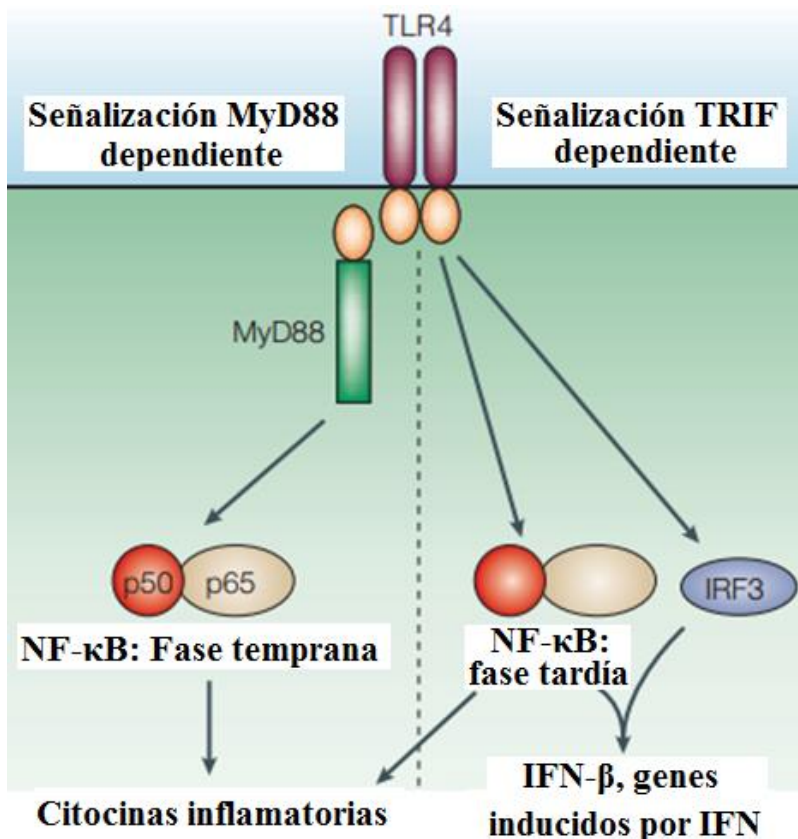
Aún no se sabe cuál es el mecanismo mediante el cual estos macrófagos son reclutados al tejido adiposo, sin embargo, su rol en este proceso es el de reparar, una injuria o irritación metabólica [35, 37-40]. Los macrófagos del tipo M1 se encuentran en el TA en animales y pacientes obesos dispuestos normalmente alrededor de un adipocito en apoptosis formando estructuras semejantes a una corona (*crown-like structures*, CLS) [34, 35].

### **1.5. Macrófagos pro inflamatorios (tipo M1) y señalamiento por receptores tipo *Toll***

Como se describió anteriormente, los macrófagos que infiltran el tejido adiposo obeso son del tipo inflamatorio M1. Para cumplir su función, los macrófagos (junto a las células del sistema inmune innato) poseen receptores que reconocen patrones moleculares asociados a patógenos (PAMPs) y a peligro (DAMPs), entre los que se encuentran los receptores tipo *Toll* (receptores transmembrana de tipo 1 que presentan homología con la proteína *Toll* de *Drosophila* y el receptor de la IL-1). En la actualidad se conocen 11 TLR en humanos y 13 en ratones, con un amplio rango de ligandos que incluyen motivos estructurales presentes en bacterias, hongos y parásitos [41].

Entre los PAMP más comunes se encuentran el lipopolisacárido bacteriano (LPS) de la pared bacteriana y los ácidos grasos libres. Al ser reconocido el LPS circulante por un dímero de TLR-4 y 2 moléculas del adaptador MD-2 se produce la traducción de la señal a través de 2 posibles mecanismos (**Fig. 4**): Dependiente de MYD88 (de manera más rápida y temprana utilizando adaptadores como Mal) e independiente de MyD88 (de manera tardía

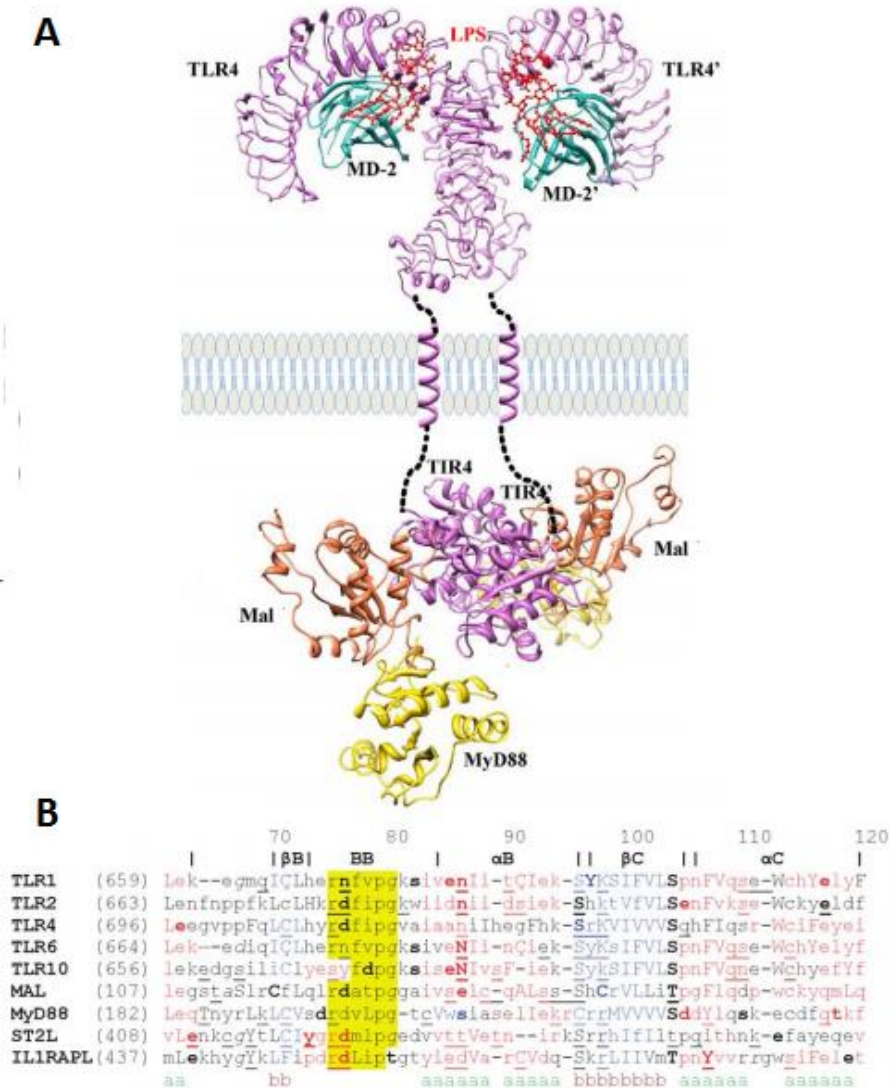
utilizando adaptadores como TRIF y TRAM) [42]. Ambas vías tienen como resultado la secreción de señalizadores inflamatorios.



**Figura 4: Señalamiento por TLR4.** La unión de LPS al receptor TLR-4 desencadena 2 vías de señalamiento: MyD88-dependiente caracterizada por activación temprana del factor nuclear- $\kappa$ B (NF- $\kappa$ B) y producción de citocinas inflamatorias; y MyD88 independiente caracterizada por la activación de factores de respuesta al interferón (IRF), activación tardía de NF- $\kappa$ B, producción de interferón- $\beta$  y genes relacionados [43].

El TLR-4 está compuesto por 3 grandes dominios: El dominio extracelular rico en leucinas (LRR) cuya función es el reconocimiento del ligando; el dominio transmembrana y el dominio intracelular TIR (**Fig. 5A**). Este último se encuentra conservado a lo largo de los TLR y a lo largo de las especies. El dominio TIR está compuesto por 180 aminoácidos y posee regiones muy conservadas (**Fig. 5B**) relacionadas con su función. Una de estas regiones

es conocida como BB-loop [44]. Ha sido demostrado que mutaciones puntuales en el BB-loop tienen como resultado la eliminación de la capacidad para traducir la señal del receptor [45]. Actualmente se encuentran cristalizados los dominios TIR de los receptores TLR 1, 2 y 10 de humano, desafortunadamente los dominios TIR del receptor TLR-4 de ratón y humano no han sido cristalizados a la fecha.

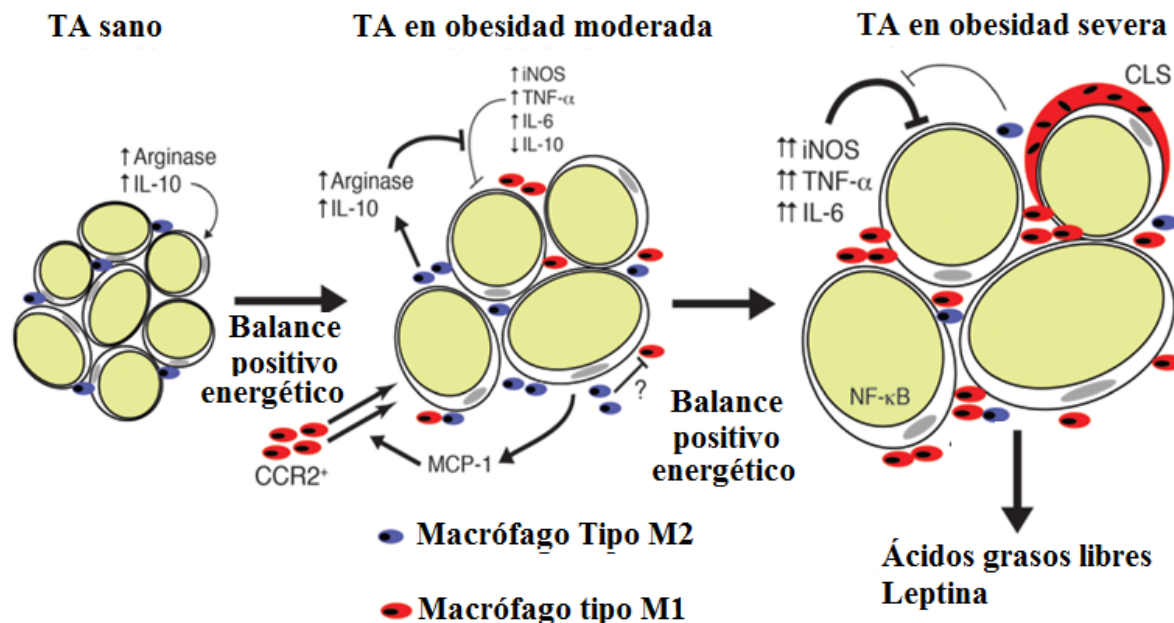


**Figura 5: Dominios del receptor TLR4:** A) Se observan modelos de cintas para el homodímero del receptor TLR4 junto a las moléculas adaptadoras MD-2 (celeste), Mal

(naranja) y MyD88 (amarillo); **B**) Secuencias Conservadas del dominio TIR a lo largo de distintas proteínas, la región BB-loop responsable de la traducción de la señal se encuentra remarcadas en amarillo. Extraído [44].

### 1.6. Causas y mecanismos de la inflamación del tejido adiposo

En el tejido adiposo obeso la irritación metabólica se produce por la hipertrofia y muerte de adipocitos al ser superada la capacidad de almacenamiento de TG dentro de las células [46], esto se debe al balance energético positivo prolongado, lo que conduce a un exceso de ácidos grasos saturados libres (AGLs) [47, 48], escape de EROs como resultado de una mitocondria que opera en  $\beta$ -oxidación [49], incremento en la cantidad circulante de LPS provenientes de las translocación a partir del intestino [50] y la desregulación de los patrones de secreción de adipoquinas proinflamatorias [51, 52] (**Fig. 6**).



**Figura 6: Infiltración de macrófagos inflamatorios en el desarrollo de la obesidad.** El tejido adiposo obeso se encuentra metabólicamente estresado por un aumento de AGL e hipoxia generados por un aumento descontrolado del tamaño de los adipocitos debido a un

exceso de energía para ser almacenada. El estrés metabólico induce la secreción de quimioninas como CCL2 quien es reconocida por monocitos circulantes CCR2<sup>+</sup>, quienes infiltran el tejido adiposo y comienzan un ciclo de inflamación de retroalimentación positiva. Traducido de [40]

Por otro lado, estudios en roedores muestran que el aumento del tejido adiposo sin un aumento proporcional en la vasculatura podría conducir a la hipoxia tisular, lo que provocaría la expresión del factor inductor de hipoxia tipo 1 (HIF-1) y genes pro-inflamatorios relacionados a NF-κB [53]. Del mismo modo, la presión parcial de oxígeno reducida en el tejido adiposo subcutáneo se correlaciona negativamente con la adiposidad en los seres humanos [54]. Por lo tanto, la hipoxia puede ser un desencadenante de inflamación del tejido adiposo e irritación metabólica. Estudios en animales y en humanos apoyan el papel del tejido adiposo en estrés del retículo endoplasmático (RE), como otro disparador clave de la inflamación en obesidad [55].

Aunque el disparador del cuadro inflamatorio en tejido adiposo no está comprendido en su totalidad se puede afirmar que en obesidad existe un estado inflamatorio a nivel de tejido adiposo que se ha relacionado con el aumento de la concentración de marcadores inflamatorios sistémicos. Estos marcadores sugieren un comienzo temprano de los mecanismos patológicos que pueden favorecer las complicaciones de obesidad [56, 57].

### **1.7. Espin traps, su desarrollo para el estudio de radicales libres y sus efectos anti-inflamatorios**

Los espin traps fueron sintetizados originalmente con el objeto de atrapar y estabilizar radicales libres. En condiciones fisiológicas, los organismos aeróbicos utilizan el oxígeno para generar ERO y especies reactivas del nitrógeno (ERN) [58]. Los radicales libres son altamente reactivos y poseen un tiempo de vida media del orden de milisegundos. Los radicales libres también son producidos en situación de estrés celular de tipo mecánico, metabólico e inmunológico entre otros [59]. En estos escenarios se produce un desbalance redox debido a una mayor producción especies reactivas. El aumento en la concentración de EROs tiene como consecuencia la generación de radicales intermediarios en proteínas y

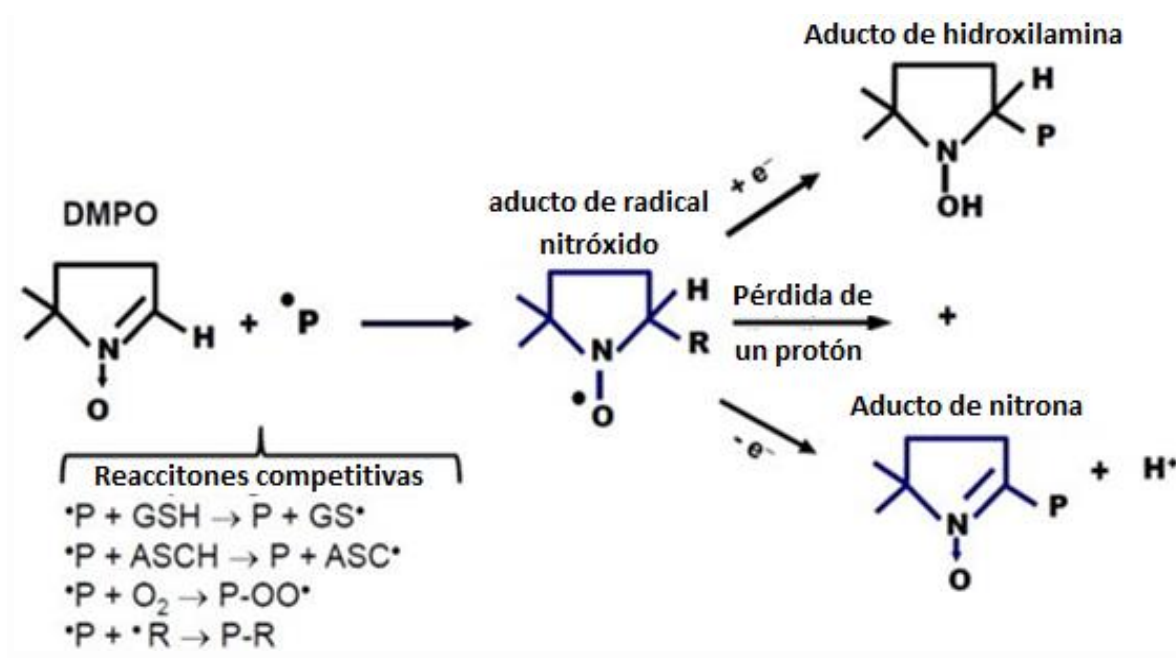
ácidos nucleicos que decaen en diferentes productos finales de oxidación [60] constituyendo un estado de estrés oxidativo.

La técnica de resonancia por electrón spin (ESR) hizo posible la detección directa de radicales libres de vida corta, pero esta técnica posee una sensibilidad muy baja como para ser utilizada en sistemas biológicos [61]. En este sentido se desarrolló la técnica de “*spin trapping*” que consiste en combinar un radical libre de vida corta con una molécula diamagnética (espin trap) para formar un radical más estable (radical aducto) [62]. Al extenderse la vida media del radical se incrementa su concentración haciendo posible su detección por ESR y otras técnicas [63].

Entre los espin traps más utilizados para el estudio de los radicales libres se encuentran *N-tert*-butil- $\alpha$ -fenilnitrona (PBN) y 5,5-dimetil-1-pirrolina *N*-óxido (DMPO). Este último es el más utilizado debido a su versatilidad, propiedades físico-químicas, capacidad de atravesar membranas biológicas y a su baja toxicidad [64, 65].

Cuando un spin trap reacciona con un sitio radicalario en una macromolécula, se produce un compuesto intermediario que detiene el proceso oxidativo subsecuente, por lo que la acumulación de productos oxidados disminuye [66].

Una vez formado el compuesto intermediario con por ejemplo una proteína-nitrona aducto este puede presentar 3 estados de oxidación posibles (**Fig. 7**): aducto de radical nitróxido, el aducto de hidroxilamina correspondiente a la reducción de un electrón y el aducto de nitrona correspondiente a la oxidación de un electrón.



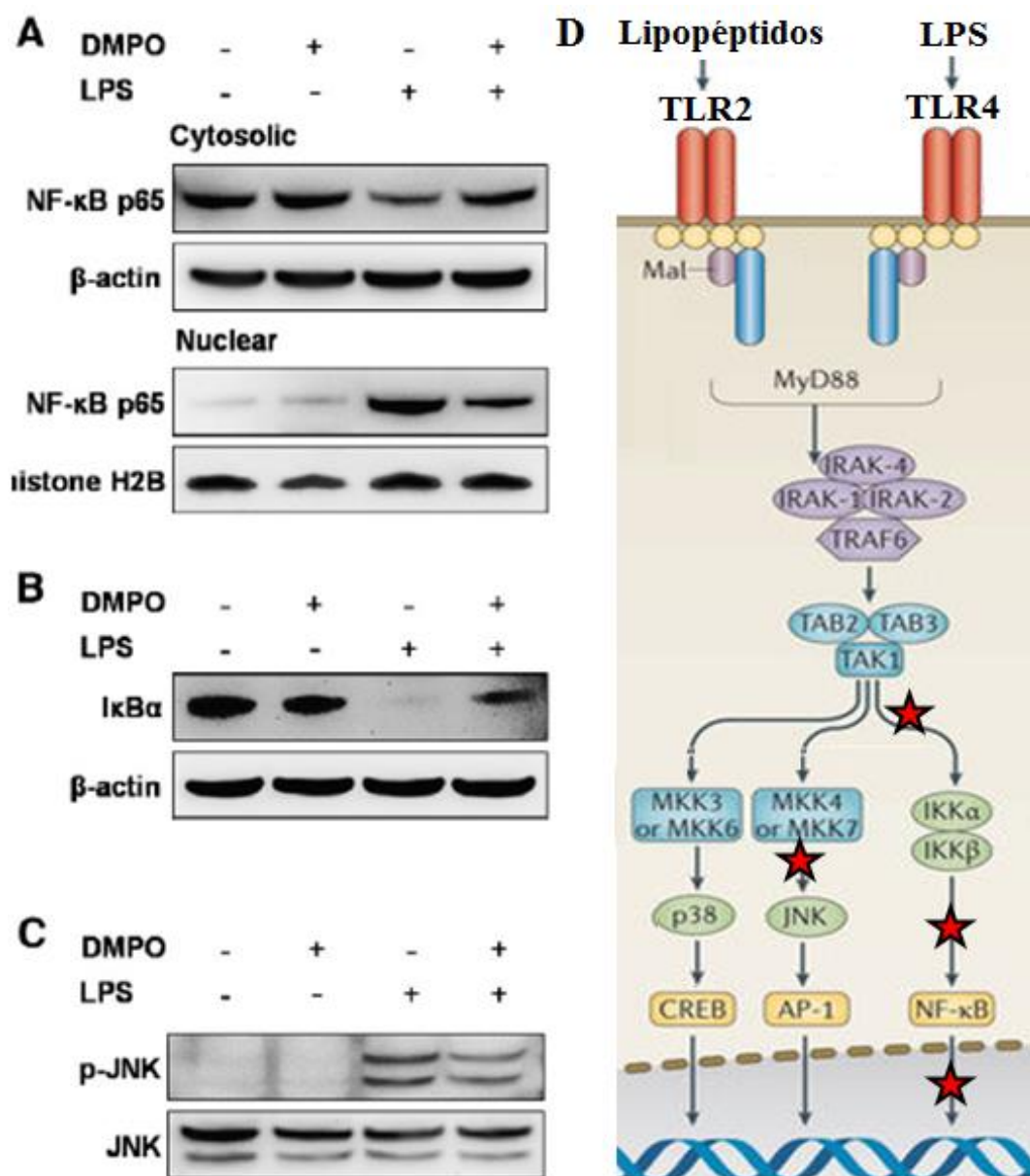
**Figura 7: Spin trapping: destino de los aductos proteína-DMPO.** Una proteína radicalizada reacciona con DMPO formando un aducto de radical nitróxido. Dependiendo del microambiente y de las características estructurales de la proteína, el radical nitróxido puede ser reducido al aducto de hidroxilamina o bien oxidado al aducto de nitrona (favorecido termodinámicamente). Traducido de [61]

Tanto el radical aducto nitróxido como el aducto de hidroxilamina son inestables y se descomponen con el paso del tiempo, mientras que el aducto de nitrona es termodinámicamente estable y puede ser estudiado en diversos modelos experimentales de inflamación e injuria [67].

En condiciones fisiológicas, dentro de la célula existen reacciones competitivas que pueden afectar el rendimiento en la reacción de formación del aducto proteína-DMPO (Figura 7). Antioxidantes como glutatión (GSH) y L-ascorbato (ASCH) reaccionan más rápido que DMPO [68] con el radical libre para formar un compuesto de baja reactividad o para terminar el proceso radicalario [69]. El oxígeno molecular, el mejor espin trap encontrado en la naturaleza, reacciona con proteínas radicalizadas para formar peroxiradicales que reaccionan muy lentamente con DMPO. A su vez, radicales proteicos pueden reaccionar con moléculas similares formando enlaces cruzados covalentes (*cross-linked proteins*) [67].

Al reaccionar un espin trap como DMPO con un radical libre, no solo se produce la formación de un producto intermediario más estable sino que también se constituye un nuevo epítipo factible de ser reconocido usando técnicas inmunológicas. Este es el principio de la técnica denominada *inmuno-spin trapping* (IST) [63] que utiliza la especificidad de anticuerpos contra DMPO como sonda para detectar aductos proteína-DMPO. Si bien la reacción de formación del aducto proteína-DMPO es utilizada para la identificación y localización celular de macromoléculas oxidadas, la misma detiene la reacción en cadena radicalaria y por lo tanto disminuye la acumulación de productos de oxidación. Por ende, al reducir la acumulación de productos oxidados, DMPO protege a las células de los efectos citotóxicos producidos por una exagerada producción de EROs y sus efectos tóxicos. Esta idea dio lugar a la búsqueda de los efectos protectores de DMPO en modelos celulares de estrés inducido. Nuestro grupo de trabajo ha reportado que 50 mM DMPO es capaz de proteger la apoptosis inducida por LPS en la línea celular RAW 264.7 [66]. Dicho efecto citoprotector se encuentra acompañado por un marcado efecto anti-inflamatorio relacionado a la reducción en la secreción de citocinas pro-inflamatorias y ON junto a una interferencia en la vía de señalamiento del factor de transcripción NF- $\kappa$ B (**Fig. 8**) [70].





**Figura 8: Efectos de DMPO en la vía de señalamiento del factor de transcripción NF- $\kappa$ B en macrófagos estimulados con LPS.** **A)** Células RAW 264.7 fueron incubadas con LPS (1 ng/ml) en presencia o ausencia de DMPO (50mM) por 1 hora, luego se fraccionó el núcleo del citoplasma y se evaluó por western-blot los niveles de la subunidad p65 de NF- $\kappa$ B. **B)** y **C)** Incubación por 15 minutos y evaluación de la degradación de I $\kappa$ B $\alpha$  y fosforilación de JNK por Western blot. **D)** Esquema de la vía de señalización por TLR dependiente de Myd88. Las estrellas indican el sitio de acción de DMPO [70].

Efectos anti-inflamatorios similares han sido observados con el espin-trap PBN en modelos celulares *in vitro* [71]. Sin embargo los efectos de PBN en modelos *in vivo* de animales con estrés oxidativo han sido estudiados en mayor proporción que los efectos producidos por DMPO. Derivados de PBN como la nitrona NXY-059 han alcanzado fase III de pruebas clínicas [72, 73] mientras que los efectos de DMPO en animales no están bien definidos a la fecha. De manera preliminar, ha sido informado que la administración de DMPO reduce la mortalidad de ratas con shock endotóxico inducido por LPS [74] y protege contra la lesión inducida por reperusión o arritmias en modelos de corazón aislado de rata[75]. Estos efectos han sido relacionados mayormente a la capacidad de atrapar radicales libres de los espin traps.

Estos efectos anti-inflamatorios del DMPO no pueden ser explicados por la capacidad de la nitrona de reaccionar con ROS debido a su baja constante de reacción ( $10 \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$ ) [76]. Por otro lado, tampoco se puede explicar el efecto anti-inflamatorio por la interferencia en el proceso de acumulación de productos de oxidación final debido a que los cambios observados son muy tempranos (15 minutos) [66, 77]. Además, en condiciones *in vivo*, DMPO compite con moléculas anti-oxidantes y otras macromoléculas radicalizadas que poseen reacciones competitivas debido a sus constantes de reacción con mayores a las de la formación del aducto de nitrona [78]. Por último, los efectos anti-inflamatorios no pueden ser explicados por DMPO interfiriendo en señalamientos dependientes del estado redox de las moléculas debido a que las oxidaciones en estos procesos no involucran formación de radicales libres como productos intermediarios (oxidación/reducción de par de electrones) [79]. Por lo tanto DMPO no puede unirse a ellos. Al día de la fecha, los mecanismos por los cuales DMPO ejerce su efecto anti-inflamatorio son desconocidos.



---

# HIPÓTESIS Y OBJETIVOS

---



## HIPÓTESIS CENTRAL

En base a lo descrito previamente indicarían que los efectos anti-inflamatorios de DMPO no pueden ser explicados por su capacidad de atrapar radicales libres. En base a esto se planteó la siguiente hipótesis central de trabajo (**Fig. 9**):

El espin trap DMPO inhibe la activación inflamatoria de los macrófagos inducida por endotoxina mediante sus efectos a corto y largo plazo. Los efectos a corto plazo se deberían a una interferencia en la cascada de señalamiento gatillada por estresores encontrados en el microambiente, mientras que los efectos a largo plazo se deberían a cambios transcriptómicos que cambian el fenotipo de los macrófagos en sitios de inflamación crónica como el tejido adiposo obeso.

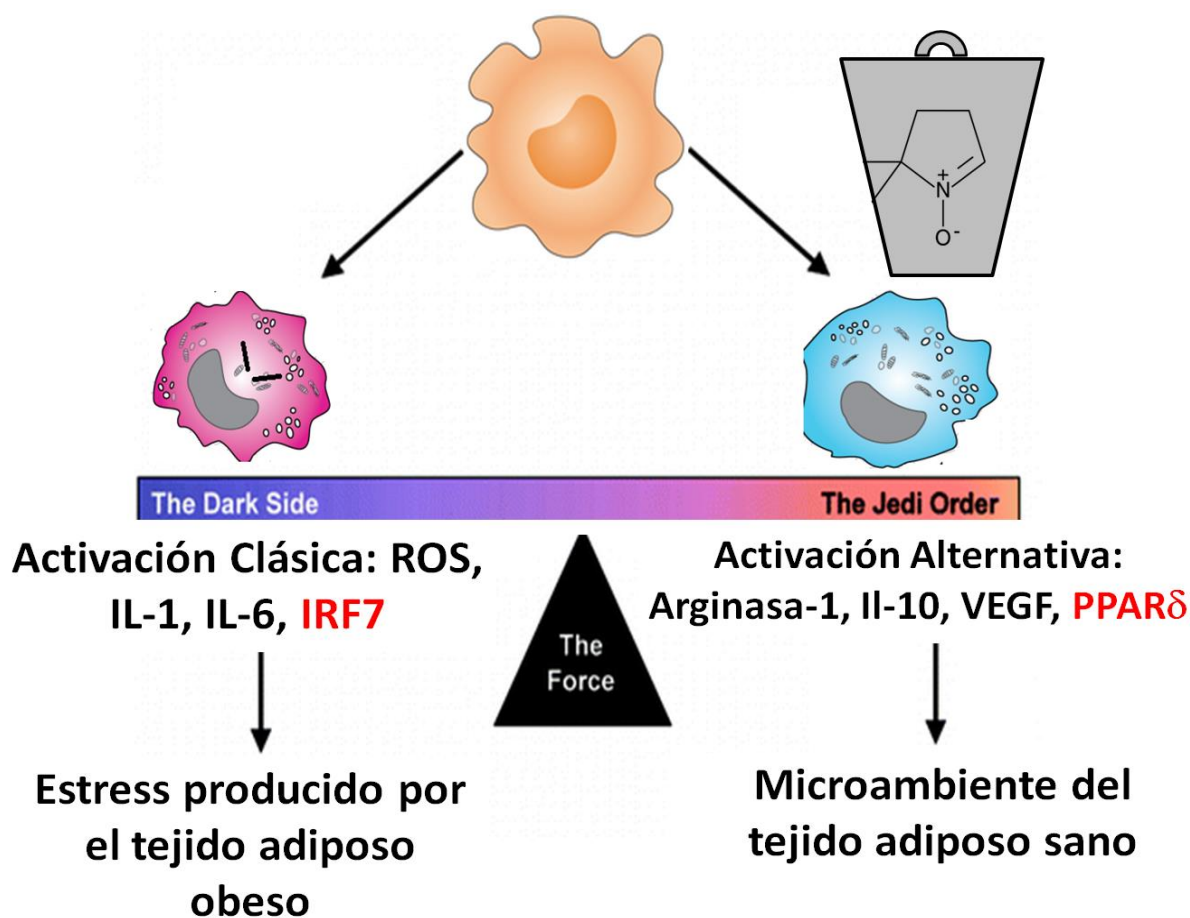


Figura 9: hipótesis central de trabajo

## OBJETIVOS

**Para corroborar la hipótesis central se fijaron los siguientes objetivos:**

1. Estudio de los efectos de DMPO sobre la activación inflamatoria de los macrófagos estimulados con LPS a corto plazo.
  - a. Estudio *in vitro* de los efectos de DMPO sobre la producción de NO y anión superóxido ( $O_2^{\bullet-}$ )
  - b. Estudio *in silico* de la interacción de DMPO con el dominio TIR del receptor Toll-2 (TLR-2)
2. Estudio de los efectos a largo plazo de DMPO y LPS sobre el perfil de activación de macrófagos murinos.
  1. Estudio transcriptómico:
    - a. Estudio de los efectos de DMPO sobre el transcriptoma de macrófagos en reposo
    - b. Estudio de los efectos de LPS sobre el transcriptoma de macrófagos
    - c. Estudio de los efectos de DMPO sobre el transcriptoma de macrófagos estimulados con LPS.
  2. Confirmación de los datos obtenidos en el análisis bioinformático de los datos de microarray
3. Estudio de los efectos anti-inflamatorios de DMPO in-vivo en un modelo de instilación intratraqueal a ratones con síndrome metabólico.



---

# MATERIALES Y MÉTODOS

---



## **MATERIALES Y MÉTODOS**

### **Cultivo Celular**

Se utilizó la línea celular de macrófagos murinos RAW 264.7 (ATCC TIB-71, Rockville, MD). Las células fueron cultivadas a 37°C con una atmósfera compuesta de 5% de CO<sub>2</sub> en medio Dubelco modificado (Dubbelco's Modified Eagle Medium; N° de catálogo: # P3030-001; EMEVE medios; Laboratorio Microvet SRL; CABA, Argentina) suplementado al 10% con suero fetal bovino (Natocor, Argentina). Se utilizaron las células comprendidas entre los pasajes 4 y 12 respecto al inicio del cultivo.

### **Tratamientos con DMPO y LPS**

Para los experimentos con lipopolisacárido se utilizó LPS (*Escherichia coli*, serotipo 055:B5, L2637-SIGMA). Por otro lado, se utilizó el espin trap DMPO de Dojindo Molecular Technologies, (N° de catálogo: D048-10; Tokyo; Japón). Para los experimentos de incubación las células fueron cultivadas en frascos tipo T-25/75 durante 24 horas, luego el medio fue removido y reemplazado por DMEM con distintas concentraciones de LPS y/o 50 mM DMPO. La dosis de DMPO fue elegida debido a que no causa efectos citotóxicos y disminuye la respuesta inflamatoria causada por 1 ng/ml LPS [1].

### **Determinación indirecta de la producción de ON**

La acumulación de nitritos en el sobrenadante de los cultivos fue utilizada como indicador de producción de ON utilizando el reactivo de Griess[2]. 10<sup>5</sup> células fueron cultivadas en placas de 96 pocillos y estimuladas con 200 µl de diferentes concentraciones de LPS en la presencia o ausencia de 50 mM DMPO por 24 horas. A lo largo de las 24 horas, el sobrenadante fue recolectado en distintos tiempos para la medición de acumulación de nitritos por reacción colorimétrica a una longitud de onda de 545 nm (microplacas TECAN Infinito M200 PRO, Research Triangle Park, Carolina del Norte). Se utilizó como standard nitrito de sodio.

### **Ensayo de determinación de la producción de superóxido con dihidroetidio (DHE)**

La producción del radical anión superóxido fue determinada mediante el uso de la sonda DHE en RAW 264.7 cultivadas en placas de 96 pocillos (100.000 células por pocillo) [3]. Las células fueron adheridas por 24 horas, posteriormente se lavó con PBS y se agregaron los estímulos correspondientes: 1 ng/ml LPS; 50 mM DMPO; DMPO+LPS por 24 horas. Además se realizó otra condición donde se preincubó con 50 mM DMPO para luego al momento de la medición agregar 1 ng/ml de LPS. Al finalizar el tiempo de incubación, se agregó la sonda DHE en PBS a una concentración de 20  $\mu$ M. Luego se midió la fluorescencia ( $\lambda$ excitación= 518 nm  $\lambda$ emisión= 608 nm). Los resultados se expresan en unidades arbitrarias de fluorescencia respecto al control.

### **Simulación de “docking”**

Se realizó una simulación de docking utilizando el software AutoDock (Molecular Graphics Laboratory; The Scripps Research Institute; CA, USA) de DMPO sobre toda la superficie del dominio TIR de TLR2 (código en el *Protein Data Bank* = 1FYW) sin especificación previa del sitio de unión (Docking ciego). Las conformaciones resultantes fueron agrupadas en familias respecto a la desviación media cuadrática (RMSD) de la cadena central proteica. La conformación de menor energía de cada familia fue considerada la orientación más favorable.

### **Dinámica Molecular**

Luego de la simulación de docking las estructuras de menor energías fueron refinadas por simulaciones de dinámica molecular utilizando el campo de fuerza Amber16 [4]. Para determinar el modo de unión más favorable de DMPO se calculó para cada estructura el índice *Molecular Mechanics Poisson Boltzmann Surface Area* (MMPBSA). Por último, la estructura de la energía libre más favorable fue sometida al estudio de interacción utilizando *Theory Quantum Atoms in Molecules* (QTAIM) calculations [5].



## **Extracción de ARN para microarreglos y nCounter**

Células RAW 264,7 fueron incubadas en frascos T-75 por triplicado con 1 ng/ml LPS en presencia o ausencia de 50 mM DMPO. Células incubadas con DMEM sin estímulos fueron utilizadas como control. Al cabo de 6 horas de incubación, se retiró el sobrenadante, se lavó con PBS y se utilizaron “scrappers” descartables para despegar las células del frasco. Luego se centrifugó a 1000 g por 5 minutos a 4°C y el pellet resultante fue utilizado para la extracción de ARN utilizando el kit comercial RNEasy MIDI (QUIAGEN). El ARN purificado fue cuantificado utilizando NanoDrop® y se analizó su pureza con Bioanalyzer. 50 ug de ARN fueron luego hibridados con una plataforma de tecnología de microarreglos (Illumina Mouse genome Set ver. 6.1-38000 transcripts) y una plataforma de Nanostrings Mouse ImmunologyCodeset (NS\_Immunology\_C2269-547 transcripts). Las expresión génica de las muestras hibridadas con Nanostring fueron cuantificadas utilizando nCounter Digital Analyzer™ y normalizada utilizando los controles positivos y negativos provistos por el fabricante con nSolver (v3.0)™ software. Se utilizó como gen control GAPDH.

## **Análisis bioinformático de los datos de microarray**

Se analizó la expresión de los transcripts contenidos en el chip Illumina Mouse genome Set ver. 6.1. Se utilizaron los controles negativos y positivos provistos por el fabricante. Posteriormente la data fue transformada al Log base=2, normalizada por quantil, filtrada por el percentil 5%. 1117 transcripts fueron filtrados en este procedimiento dando lugar a 37.555 transcripts restantes. Luego se realizó un análisis de componente principal (PCA) entre los replicados biológicos y se lo representó en un gráfico de 2 dimensiones. A continuación se realizaron las relaciones de expresión entre las condiciones respecto al control (Control vs DMPO; Control vs LPS; DMPO-LPS vs LPS) utilizando ANOVA de una vía (utilizando una relación de falso descubrimiento = 0.05 FDR[6]) para determinar cuáles de los transcripts se expresaban de manera diferencial (con un cambio de al menos 1.5 veces respecto al control) y estadísticamente significativa (Differentially expressed genes o DEGs). Las 3 listas de genes expresados diferencialmente fueron representadas en un diagrama de Venn y analizadas utilizando Database for Annotation, Visualization and Integrity Discovery (DAVID database ver. 6.8) en búsqueda de identificar funciones biológicas enriquecidas

relacionadas a la ontogenia génica (Gene ontology). Por último, las 3 listas DEGs fueron analizadas utilizando Ingenuity Pathway Analysis (IPA software- QUIAGEN) para determinar vías de señalamiento canónicas afectadas y posibles reguladores “*up-stream*”.

### **Determinación de IFN- $\beta$ por ELISA**

Células RAW 264.7 fueron incubadas con 1 ng/ml LPS en presencia o ausencia de 50 mM DMPO durante 24 horas en frascos T-25. Al finalizar la incubación, los sobrenadantes fueron recolectados para la determinación de la concentración de IFN-beta utilizando el kit comercial Mouse IFN-beta ELISA kit (N° de catálogo: MIFNB0; R&D Systems; MN; USA)).

### **Análisis semi-cuantitativo de los niveles del ARNm de IRF7 por RT-PCR**

Células RAW 264,7 fueron incubadas con 1 ng/ml LPS en presencia o ausencia de 50 mM DMPO durante 24 horas en frascos T-25. Al finalizar la incubación se realizó la extracción de ARN utilizando el kit comercial RNeasy (QUIAGEN). La integridad del ARNm fue determinada realizando una corrida electroforética en gel de agarosa al 0.8%, usando buffer TAE 1X y Gel Red (1 $\mu$ l /50ml de gel) como colorante. La retrotranscripción se llevó a cabo a partir de 3  $\mu$ g del ARN total utilizando la enzima Transcriptasa reversa del virus de leucemia murina MMLV (PB-L Productos Bio-logicos, Buenos Aires, Argentina). Luego se realizan las PCR de los cDNA obtenidos, para lo que se emplea primers específicos, diseñados en el programa GENBANK y se corroboró si los primers eran correctos usando el software LALING ([www.ch.embnet.org/software/laling\\_form.html](http://www.ch.embnet.org/software/laling_form.html)). Primer IRF7 Fw: GCAAGAGAAAATGCTGGGCT; Primer IRF7 Rv: TAGGGTTCCTCGTAAACACGGT. Se utilizó como control de carga el gen gliceraldehído fosfato deshidrogenasa-3 (GAPDH): Fw: GGAGCCTTTAGACCTCAACAGA; Rv TGAACGAGGAGGGTGGTG

## **Preparación de los lisados celulares**

Luego de la incubación con los distintos tratamientos, se removió el medio con estímulo y se lavó con PBS frío. Posteriormente las células fueron lisadas utilizando el buffer RIPA (1M Tris-HCl, 10% NP-40, 10% deoxicolato de sodio, 1M de cloruro de sodio, 100mM DTPA, 1M ortovanadato de sodio y 1M NaF) conteniendo 1% (v/v) de cocktail inhibidor de proteasas (N° de catálogo: M220; Amresco; OH; USA) por 20 minutos en hielo. Por último el homogenato celular fue centrifugado a 13.200 g por 15 minutos y se recolectó el sobrenadante para la posterior determinación de proteínas utilizando el método de Bradford [7].

## **Análisis de los lisados celulares por la técnica de western-blot**

Los lisados celulares fueron mezclados con el buffer de muestra 4×SDS NuPAGE (Invitrogen) y desnaturalizadas por 5 minutos a 90 grados en placa de calentamiento. Luego se separaron por electroforesis 15 µg de proteínas en geles de poliacrilamida “4-12% reducing NuPAGE Bis-Tris” (Invitrogen) y transferidas a membranas de nitrocelulosa que fueron bloqueadas utilizando 5% albúmina bovina en TBS. Por último, se incubaron las membranas por 1 hora a temperatura ambiente tanto los anticuerpos primarios (dilución 1/1000 en buffer de bloqueo) como los anticuerpos secundarios fluorescentes de la empresa LI-COR (dilución 1/15000 en buffer de bloqueo). Los inmunocomplejos fueron visualizados utilizando el equipo OdysseyClx (LI-COR) y la imagen fue tratada con el software ImageStudio ver 5.1 (LI-COR). Se utilizaron los anticuerpos primarios ABCAM producidos en conejo dirigidos a PPAR $\delta$ , HO-1, beta-actina. Beta-Actina fue utilizada como control de carga.

## **Modelo experimental de síndrome metabólico**

La alimentación de roedores con una dieta rica en grasa de pollo y fructosa puede inducir a la obesidad y en consecuencia a trastornos metabólicos semejando al SM [8] [9]. Se trabajó con ratones machos wild-type C57BL/6J, con 6 semanas de vida, criados en el bioterio de la

Universidad Nacional de San Luis. El peso inicial (g) de los animales fue de  $20,2 \pm 0,9$ . Los animales fueron divididos aleatoriamente en 2 grupos: dieta baja en grasas (LFD) como grupo control; y dieta rica en grasa + fructosa (HFD+F) como grupo experimental con SM. La fructosa fue agregada en el agua de bebida (10% de fructosa; ENA Sports, Buenos Aires, Argentina). Los animales fueron mantenidos durante 16 semanas. Todos los ratones se colocaron en jaulas individuales con una temperatura de  $23 \pm 1^\circ \text{C}$ , con un ciclo de 12 h de luz/oscuridad. El agua con y sin fructosa y la comida fueron provistas *ad-libitum*. Todos los experimentos y procedimientos se ejecutaron respetando el Manual sobre Cuidados y Uso de Animales de Laboratorio [10], y aprobados por el Comité Institucional de Cuidado y Uso de Animales (CICUA), de la Universidad Nacional de San Luis (Protocolo N° B97/15) [11].

### **Composición de las Dietas**

La composición de las dietas fue realizada en base a protocolos estandarizados por el grupo de trabajo [9]. Para la preparación de la dieta LFD se utilizó alimento balanceado rata-ratón GEPSA s.a. (Córdoba, Argentina) cuyos componentes dietarios incluyen además: 6 % grasa, 40,7% de carbohidratos y 24% de proteínas. Para la dieta HFD se usó alimento balanceado GEPSA, al cual se le incorporo el 22% de aceite de pollo (Granja 3 Arroyos, Buenos Aires, Argentina). La composición final de la dieta fue: 43,77% de grasas, 22,23% de carbohidratos y 20.28% de proteínas.

### **Test de tolerancia a la glucosa**

Para la prueba de tolerancia a la glucosa, los ratones fueron mantenidos en ayunas durante 12 h y luego fueron inyectadas por vía intraperitoneal con glucosa (2 g/kg ratón). La glucosa en sangre fue medida utilizando muestras de sangre tomadas de la punta de la cola al inicio del estudio y posteriormente a los 30, 60 y 120 minutos después de la inyección de glucosa. Los niveles de glucosa fueron determinados utilizando el analizador *One-TouchUltraMini* (Johnson&Johnson, OH; USA) [12].

### **Obtención de las muestras de Tejido**

Luego de obtener las muestras de sangre, se sacrificó el animal y se procedió a la apertura del abdomen y tórax. Seguidamente se realizó la separación de grasa epididimal. Los tejidos se mantuvieron a una temperatura de  $-70^{\circ}\text{C}$ , hasta su procesamiento.

### **Preparación de homogenato de tejido**

El tejido adiposo fue homogeneizado mecánicamente (mini-cuchillas) con buffer RIPA. Los homogenatos de tejido fueron centrifugados a 14.000 rpm, durante 15 min a  $4^{\circ}\text{C}$  para eliminar los núcleos y restos celulares. Los sedimentos fueron descartados y los sobrenadantes conteniendo las proteínas fueron utilizados para determinar la concentración de carbonilos y nitritos. La concentración total de proteína en homogenato de tejido fue medido por el método de Bradford [13], utilizando albúmina sérica bovina, como estándar.

### **Obtención de las muestras de sangre y suero**

Los animales fueron ayunados durante las 12 horas previas al sacrificio. Se les extrajo sangre por punción sin anticoagulante. El suero fue separado por centrifugación a 5000 rpm durante 10 min.

### **Determinación de la concentración de TNF- $\alpha$**

Las concentraciones de TNF- $\alpha$  se midieron a partir de los sueros utilizando el kit comercial de ELISA TNF- $\alpha$  (BioVisión, Catalog # DY410). El ensayo ELISA se realizó según el protocolo del fabricante. La cantidad del sobrenadante fue de 100  $\mu\text{l}$  y se leyó a 450 nm [14].

### **Determinación de la oxidación de proteínas**

Como marcador de la oxidación de proteínas se determinaron los grupos carbonilos utilizando un ensayo de ELISA [15]. El tejido homogeneizado fue derivatizado por reacción

de grupos carbonilo en proteínas oxidadas con 2,4-dinitrofenilhidrazina en 2M HCl. En microplaca de 96 pocillos (Corning Inc, Corning, NY). Se usó la muestra derivatizada y no derivatizada, luego las microplacas fueron incubadas durante 1 h a 37 ° C con el suero policlonal de conejo anti-difenilhidrazina (dilución 1: 2000 en buffer de lavado). Los inmunocomplejos fueron cuantificados utilizando un anticuerpo de cabra anti-IgG de conejo-HRP conjugado (1/10000 en *buffer* de lavado) y la oxidación del sustrato de HRP 3,3',5,5'-tetrametilbenzidina (TMB) fue leída a 450 nm usando una lector de microplacas TECAN (InfiniTo M200 PRO, Research Triangle Park, Carolina del Norte). Los resultados se expresaron como nmol de carbonilo por miligramo de proteínas totales (nmol / mg proteínas).

### **Determinación de la concentración de proteínas nitradas**

La concentración de nitrotirosina fue determinada por ELISA. Se utilizó el suero policlonal anti-nitrotirosina obtenido en conejo (dilución 1: 1000 en buffer de lavado, obtenido en nuestro laboratorio). Los inmunocomplejos se cuantificaron utilizando un anticuerpo de cabra anti-IgG de conejo-HRP conjugado (1/10.000 en *buffer* de lavado) y la oxidación del sustrato de HRP 3,3 ', 5,5'-tetrametilbenzidina (TMB) fue leído a 450 nm. Los resultados se expresaron como nmol de nitrotirosina por miligramo de proteínas totales (nmol/mg proteínas) [16].



---

# RESULTADOS

---

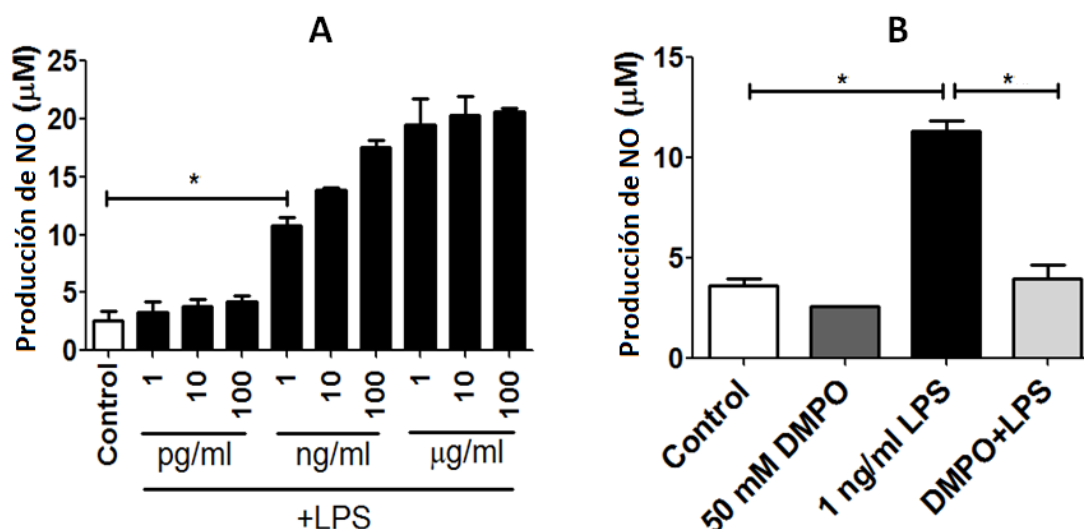


## RESULTADOS

### 1. A: Estudio in-vitro de los efectos de DMPO sobre la producción de ON y anión superóxido ( $\text{O}_2^-$ )

Como primer paso para abordar el estudio sobre los posibles mecanismos por los cuales DMPO ejerce su efecto anti-inflamatorio, basados en los resultados preliminares expuestos previamente se decidió comenzar reproduciendo los experimentos realizados en el modelo in-vitro compuesto por la línea celular de macrófagos murinos RAW 264,7 expuestos a 1 ng/ml LPS en presencia o ausencia de 50mM DMPO por 24 horas. Dicho modelo experimental es uno de los más utilizados para estudiar el mecanismo de activación inflamatoria clásica (tipo M1) de los macrófagos [94].

Para la puesta a punto del modelo experimental se realizó la determinación de nitritos en el sobrenadante de cultivo utilizando la reacción de Griess (**ver Fig. 10**). La acumulación de nitritos se utilizó como medida indirecta de la producción de ON por parte de los macrófagos estimulados con LPS.



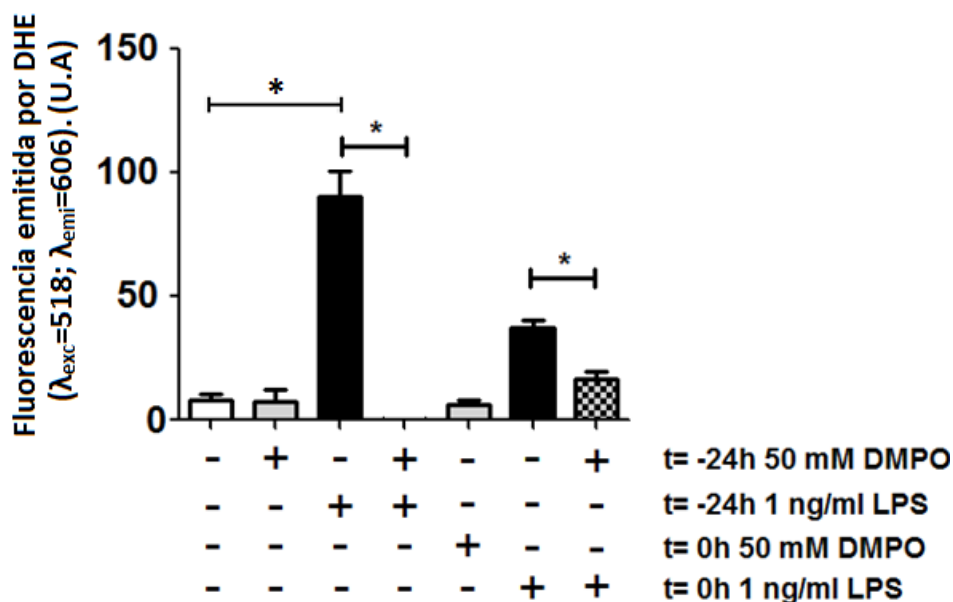
**Figura 10: Efecto de DMPO sobre la producción de NO en macrófagos estimulados con LPS.** Determinación de nitritos sobre el sobrenadante de células utilizando la reacción de Griess: **A)** Cultivo de células RAW 264,7 incubadas por 24 h con concentraciones crecientes



de LPS; **B)** Células RAW 264.7 fueron estimulados con 1 ng/ml LPS por 24 h en presencia o ausencia de 50 mM DMPO. Los valores observados corresponden al promedio de 3 experimentos independientes.  $*=P < 0,001$ .

Los resultados corroboraron que 1 ng/ml LPS es suficiente para la activación de la producción de ON (**Fig. 10A**) y que este fenómeno es inhibido completamente por la presencia de 50 mM DMPO (**Fig. 10B**) en incubaciones de 24 horas [70] indicando el correcto funcionamiento del modelo experimental utilizado.

Como se ha mencionado previamente los efectos anti-inflamatorios de DMPO a 15 minutos de su agregado [70] no pueden atribuirse a la capacidad de espin trap como tampoco a la disminución de los productos finales de oxidación. Por tal motivo se realizaron experimentos donde DMPO fuese preincubado o agregado simultáneamente junto con LPS al momento de la medición. Para lograr una determinación en etapas tan tempranas determinamos la producción del anión superóxido, el cual es formado en los primeros segundos luego de la activación del TLR-4 por parte de LPS [95], utilizando la sonda fluorescente dihidroetidio (**Fig. 11**) [81].



**Figura 11: Determinación de los efectos de la preincubación de DMPO en la producción de superóxido sobre macrófagos utilizando la sonda dihidroetidio (DHE). Células RAW**

264,7 fueron estimuladas con: 1 ng/ml LPS por 24 h o en el instante de la medición en presencia o ausencia de 50 mM DMPO en el instante de la medición. Por otro lado, células fueron preincubadas por 24 h con 50 mM DMPO en presencia o ausencia de LPS. Al finalizar la incubación se lavó con PBS y se agregó 20  $\mu$ M DHE, instantáneamente se midió la fluorescencia emitida ( $\lambda^{\text{exc}}=518$ ;  $\lambda^{\text{emi}}=606$ ). n=3; \* = P value < 0,01.

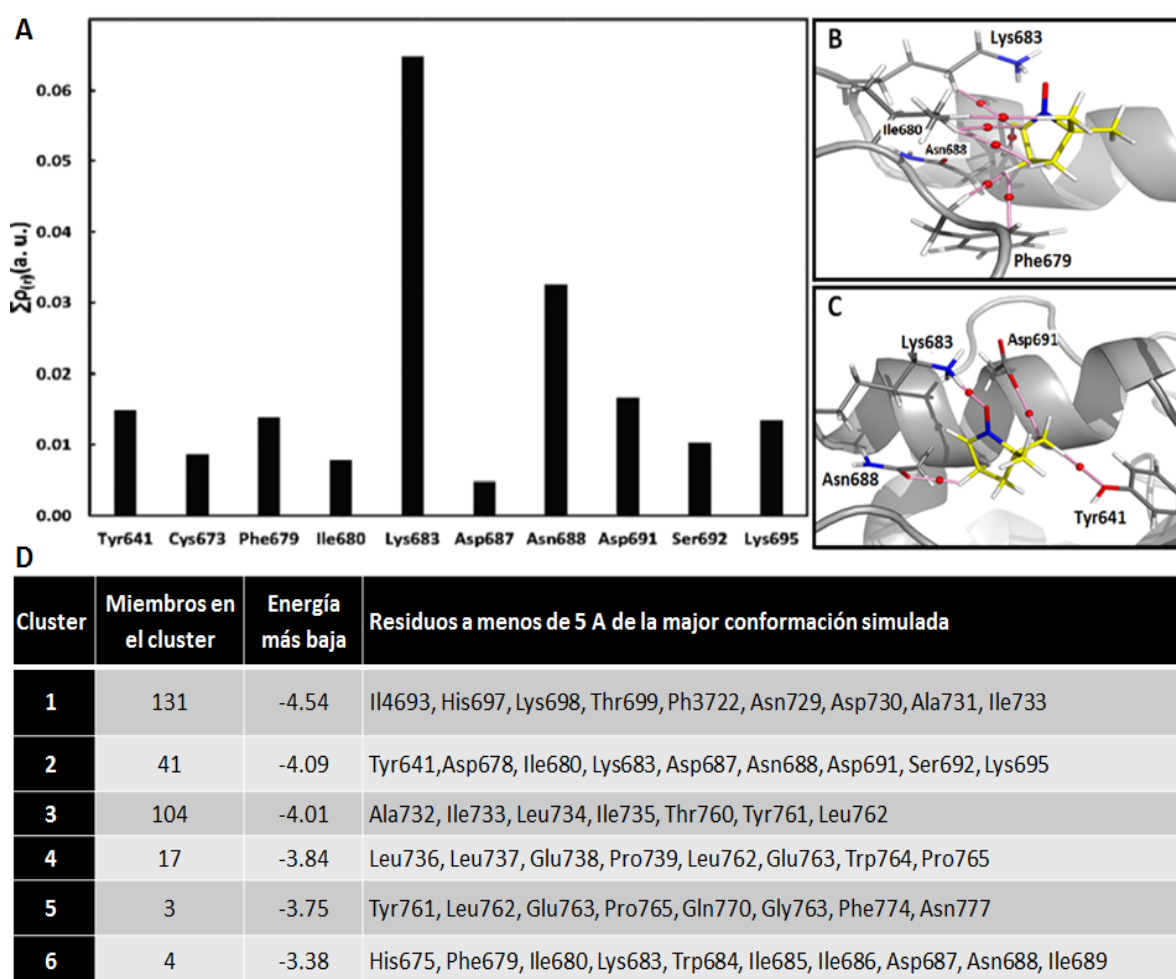
Los resultados graficados en la **Figura 11** demuestran que la preincubación con DMPO disminuye la generación de superóxido por parte de los macrófagos que fueron estimulados al momento de la determinación así como también DMPO es capaz de inhibir la producción de superóxido cuando es agregado simultáneamente al LPS al momento de la medición. Los datos indican que el efecto de DMPO es ejercido en los primeros instantes de la activación por parte del LPS, a su vez ensayos realizados previamente por el grupo de trabajo demostraron que DMPO no interviene en la unión de LPS con el receptor TLR-4 (*datos no publicados*). En base a esto, se procedió a estudiar la interacción entre DMPO y el receptor TLR.

### **1. B: Estudio *in-silico* de la interacción de DMPO con el dominio TIR del receptor Toll-like tipo 2 (TLR-2)**

Los receptores TLR poseen un dominio citoplasmático llamado TIR (Toll/interleukin-1 receptor) responsable de la traducción de señal [45]. El dominio TIR se encuentra conservado a lo largo de las especies y a lo largo de los diferentes TLR. Una de sus regiones conservadas denominada BB-Loop es esencial para su función debido a que interacciona con la proteína adaptadora Myd88 [44]. En base a esto se estudió como interacciona DMPO con el dominio TIR del receptor TLR-4, desafortunadamente el mismo no se encuentra cristalizado por lo que se procedió a utilizar el dominio TIR del receptor TLR-2. Si bien LPS es el ligando principal de TLR-4, ha sido informado que TLR-2 también interacciona con LPS y está involucrado en la señalización inducida por la endotoxina [96].

Para el estudio *in-silico* de la interacción de DMPO con el dominio TIR se realizó una simulación de docking de DMPO sobre toda la superficie del dominio TIR de TLR2 (código en el *Protein Data Bank* = 1FYW) sin especificación previa del sitio de unión (Docking

ciego). Luego de la simulación de docking las estructuras de menor energía fueron refinadas por simulaciones de dinámica molecular utilizando el campo de fuerza Amber16. Para determinar el modo de unión más favorable de DMPO se calculó para cada estructura el índice *Molecular Mechanics Poisson Boltzmann Surface Area* (MMPBSA). Por último, la estructura de la energía libre más favorable fue sometida al estudio de interacción utilizando *Theory Quantum Atoms in Molecules* (QTAIM). Los resultados se muestran en la **Figura 12A-12C**.



**Figura 12: Estudio in-silico de la interacción de DMPO con el dominio TIR de TLR-2.**

**A) Suma de los valores de la densidad de carga ( $\rho(r)$ ) en los puntos críticos de enlace** (considerando solamente las interacciones intermoleculares) entre los residuos de TLR y DMPO. **B) y C)** Representación gráfica de las interacciones no covalentes entre los residuos

del BB-loop con DMPO (coloreados en amarillo). Los enlaces conectando el núcleo son representados en palillos rosas y los puntos críticos de enlace se muestran en esferas rojas.

**D)** Tabla de las conformaciones resultantes agrupadas en familias respecto a la desviación media cuadrática (RMSD) de la cadena central protéica. Se indican los aminoácidos a una distancia máxima de 5 Å y las energías resultantes de los cálculos de dinámica molecular.

Los datos obtenidos del análisis *in-silico* fueron sorprendentes. Una pequeña molécula como DMPO podría unirse a cualquier región comprendida en los 180 aminoácidos del dominio TIR, pero interesantemente DMPO selectivamente interacciona con la región BB-loop (principalmente con Lys683) responsable de la traducción de señal (**Fig. 12**). La interacción es de tipo no covalente, dinámica y podría explicar el porqué de la interrupción de la señal de manera temprana observada en la bibliografía [70].

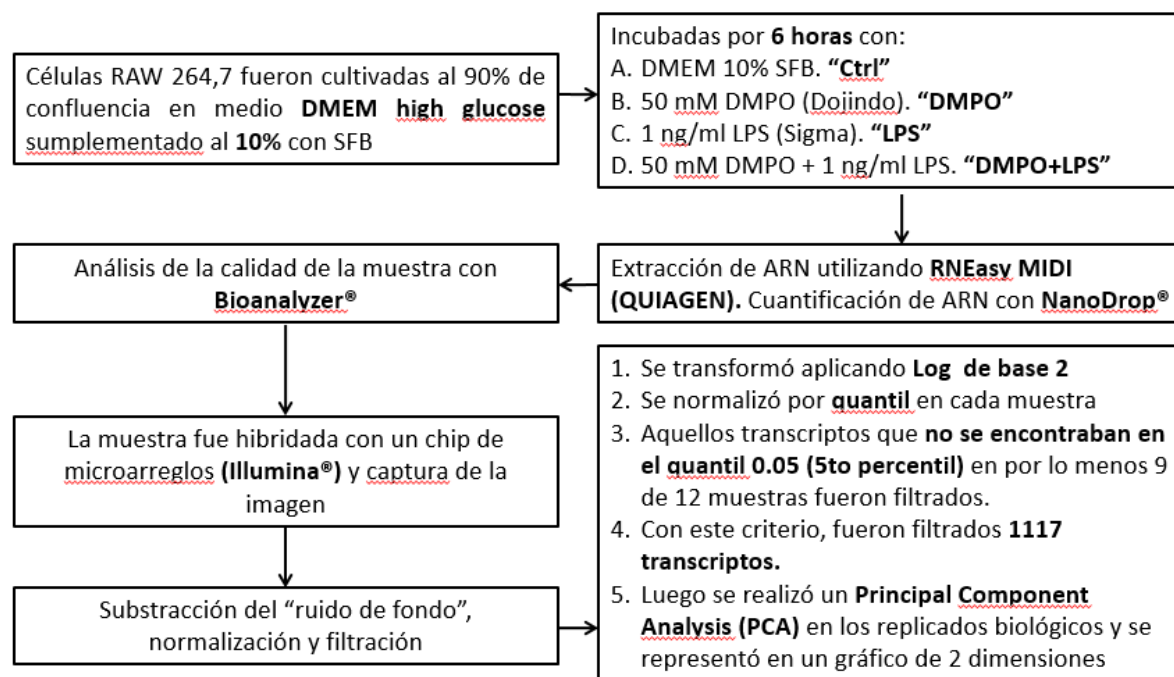
### **Conclusiones del estudio de los efectos de DMPO sobre la activación inflamatoria de los macrófagos estimulados con LPS a corto plazo**

El estudio de los efectos a corto plazo de DMPO sobre la activación de macrófagos por LPS indica que DMPO además de atrapar y estabilizar radicales libres es capaz de interferir en la vía de señalamiento de receptores TLR al unirse al dominio TIR en la región BB-loop, un evento temprano en el señalamiento pro-inflamatorio. Dicha interferencia estaría relacionada al efecto observado en la vía de señalamiento de NF-κB [70] y temprano efecto observado en la preincubación de DMPO en macrófagos estimulados con LPS al momento de la medición de la producción de superóxido utilizando la sonda DHE.

## 2.1: Estudio de los efectos a largo plazo de DMPO y LPS sobre el transcriptoma de macrófagos: Estudio transcriptómico

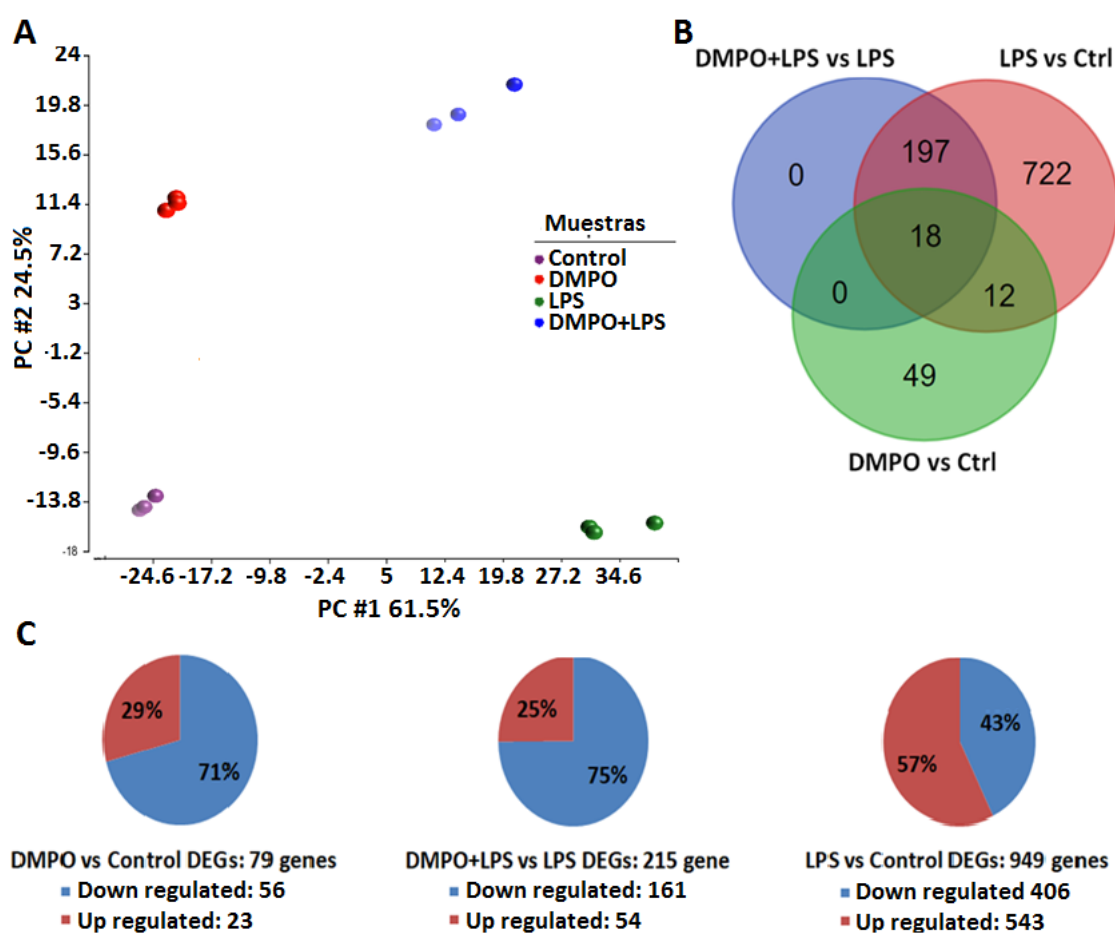
Actualmente existen estudios de los efectos de DMPO sobre los niveles de expresión del ARN mensajero de proteínas inflamatorias como iNOS y distintas citocinas en macrófagos estimulados por LPS [70], sin embargo al día de la fecha no ha sido realizado algún estudio global de los efectos de un spin-trap sobre el transcriptoma. Si bien DMPO tiene la capacidad de atrapar y estabilizar radicales libres, los efectos anti-inflamatorios observados podrían no estar relacionados exclusivamente a esta propiedad.

En base a esto estudiamos los efectos de DMPO a largo plazo sobre el transcriptoma de macrófagos. Para lo cual fue desarrollado un experimento con tecnología de microarreglos donde fue analizado el estado del transcriptoma de células RAW 264,7 estimuladas por 6 horas con 1 ng/ml LPS en presencia o ausencia de 50 mM DMPO. La **Figura 13** indica el diagrama de flujo para la preparación de la muestra y el posterior tratamiento de la información recolectada.



**Figura 13: Diagrama de flujo para el tratamiento de la muestra, recolección y tratamiento de la información substraída de la imagen tomada del microarreglo.**

Luego del tratamiento de la información recolectada, se realizaron listas de genes expresados diferencialmente (DEGs) utilizando ANOVA de una vía con un punto de corte  $Q=0,05$  (*False discovery rate*= FDR [84]) y se filtraron aquellos genes cuya variación entre las distintas muestras fuese menor a 1,5. Se realizó una representación en diagrama de Venn para las listas de DEGs y un diagrama de componentes principales (PCA, *Principal Component Analysis*) para determinar la distribución de los datos provenientes de los triplicados biológicos (Fig. 14).



**Figura 14: Análisis estadístico y representación gráfica de la información recolectada.**

**A)** Análisis de componente principal para los triplicados biológicos. **B)** Diagrama de Venn para las listas DEGs. **C).** Gráficos de torta para las listas de genes DEGs. Se indican el número total de genes así como también su comportamiento respecto a la condición Control. “Down

*regulated*” = regulado a la baja con respecto a la condición comparada. “*Up regulated*” = regulado a la alta con respecto a la condición comparada.

Los resultados del análisis PCA indican una buena calidad de la muestra con triplicados biológicos agrupados (muestras con baja desviación estándar) (**Fig. 14A**). Por otro lado el análisis del comportamiento de los transcriptos indica que LPS genera grandes cambios en el transcriptoma de macrófagos con la mayoría de los genes (57%) regulados al alta (**Fig. 14C**). En relación a la condición LPS, DMPO por sí solo genera menores cambios (79 genes) predominantemente regulando a la baja (71%). Al momento de comparar DMPO+LPS vs LPS, el 75% de las de los DEGs fueron regulados a la baja indicando que DMPO tiene un claro efecto supresor de los cambios causados por LPS.

### **2.1.a: Estudio de los efectos de DMPO sobre el transcriptoma de macrófagos no activados**

Con el propósito de determinar los efectos de DMPO sobre el transcriptoma de macrófagos en reposo o no activados se procedió a analizar las listas de DEGs utilizando la base de datos DAVID en búsqueda de identificar funciones biológicas enriquecidas (GO terms). El análisis consiste en relacionar la lista DEGs en la muestra con listas de genes presentes en funciones biológicas predeterminadas por la base de datos. Aquellas funciones biológicas que contengan mayor cantidad de genes de la lista de DEGs en la muestra serán denominadas como “enriquecidas”. Es importante señalar que el análisis no depende de la magnitud del cambio en la expresión sino que solamente depende de la lista de DEGs.

En primer lugar fue analizada la lista generada a partir de la comparación DMPO vs Control compuesta por 79 genes, de los cuales 56 se encuentran regulados a la baja (*downregulated*) y 23 regulados al alta (*upregulated*). En la **Tabla 1** se listan las 15 funciones biológicas más enriquecidas en la muestra de DMPO.

Los resultados mostrados en la Tabla 1 indican que DMPO regula distintas funciones celulares. Es importante resaltar el enriquecimiento de procesos relacionados al sistema inmune (regulación negativa) así como también funciones relacionadas al transporte y el retículo endoplasmático.

### DMPO vs Control DEGs: Funciones biológicas enriquecidas

| Funciones biológicas enriquecidas (GO term)                 | Count | %     | PValue   | Genes   |
|---|-------|-------|----------|---|
| Response to virus   | 5     | 7.69  | 1.42E-04 | IFIT3, OASL2, EIF2AK2, MX2, DHX58   |
| Transport   | 16    | 24.62 | 3.90E-04 | NCBP2, FADS2, STXBP2, SLC7A11, ITPR1, TMEM38B, DAB2, SLC17A6, ARRB2, ATP2A2, TMED3, STXBP5, GLRX... |
| Endoplasmic reticulum Ca++ homeostasis                      | 3     | 4.62  | 8.67E-04 | HERPUD1, ATP2A2, ITPR1  |
| Response to endoplasmic reticulum stress                    | 4     | 6.15  | 0.002    | HERPUD1, ATP2A2, SDF2L1, PDIA6  |
| Defense response to virus                                   | 5     | 7.69  | 0.002    | IFIT3, OASL2, EIF2AK2, MX2, DHX58   |
| Immune system process                                       | 6     | 9.23  | 0.007    | IFIT3, SMPDL3B, OASL2, EIF2AK2, MX2, DHX58  |
| Innate immune response                                      | 6     | 9.23  | 0.008    | IFIT3, SMPDL3B, OASL2, EIF2AK2, MX2, DHX58  |
| Response to drug  | 5     | 7.69  | 0.022    | LPL, VEGFC, FOS, NPC1, GCLM   |
| Response to toxic substance                                 | 3     | 4.62  | 0.030    | FOS, EIF2AK2, SLC7A11   |
| Negative regulation of cell proliferation                   | 5     | 7.69  | 0.033    | IFIT3, VEGFC, ASPH, EIF2AK2, TES  |
| Apoptotic process   | 6     | 9.23  | 0.033    | DAB2, SGK1, NISCH, CYFIP2, FGF13, ITPR1   |
| Activation of cys-type endopeptidase activity               | 2     | 3.08  | 0.034    | CYFIP2, ASPH  |
| Protein transport   | 6     | 9.23  | 0.038    | DAB2, ARRB2, TMED3, STXBP5, STXBP2, VPS26B  |
| Negative regulation of toll-like receptor signaling pathway | 2     | 3.08  | 0.043    | ARRB2, SMPDL3B  |
| Negative regulation of innate immune response               | 2     | 3.08  | 0.046    | SMPDL3B, DHX58  |

**Tabla 1: DMPO vs Control DEGs: Funciones biológicas enriquecidas.** La tabla se encuentra compuestas por: **“GO term”** correspondiente a las funciones biológicas enriquecidas por los genes presentes en la muestra; **“Count”** correspondiente al número de genes responsables de el “enriquecimiento”; **“%”** correspondiente al porcentaje de genes presentes en la muestra respecto al total de genes presente en la lista de ontología génica; **“Pvalue”** correspondiente a la significancia estadística del enriquecimiento; **“Genes”** correspondiente a los símbolos de los genes comprendidos en las muestras contenidos en las listas de GO.

A continuación se profundizó el análisis utilizando el software *Ingenuity Pathway Analysis* (IPA) en búsqueda de identificar vías de señalamiento enriquecidas y redes de interacción asociadas así como también realizar predicciones de proteínas que podrían estar relacionadas al efecto observado (**reguladores “upstream”**).

El análisis funcional de IPA es una medida de la posibilidad de aleatoriedad que tiene la asociación generada entre una lista de genes contenidos en el experimento y un proceso o vía de señalamiento determinado. Se calcula un valor P utilizando el test *Right-Tailed Fisher Exact*. Mientras más chico es el valor P es menos probable que la asociación sea aleatoria



por lo que es más significativa. En general, valores de P menores a 0.05 indican significancia estadística (asociación no aleatoria).

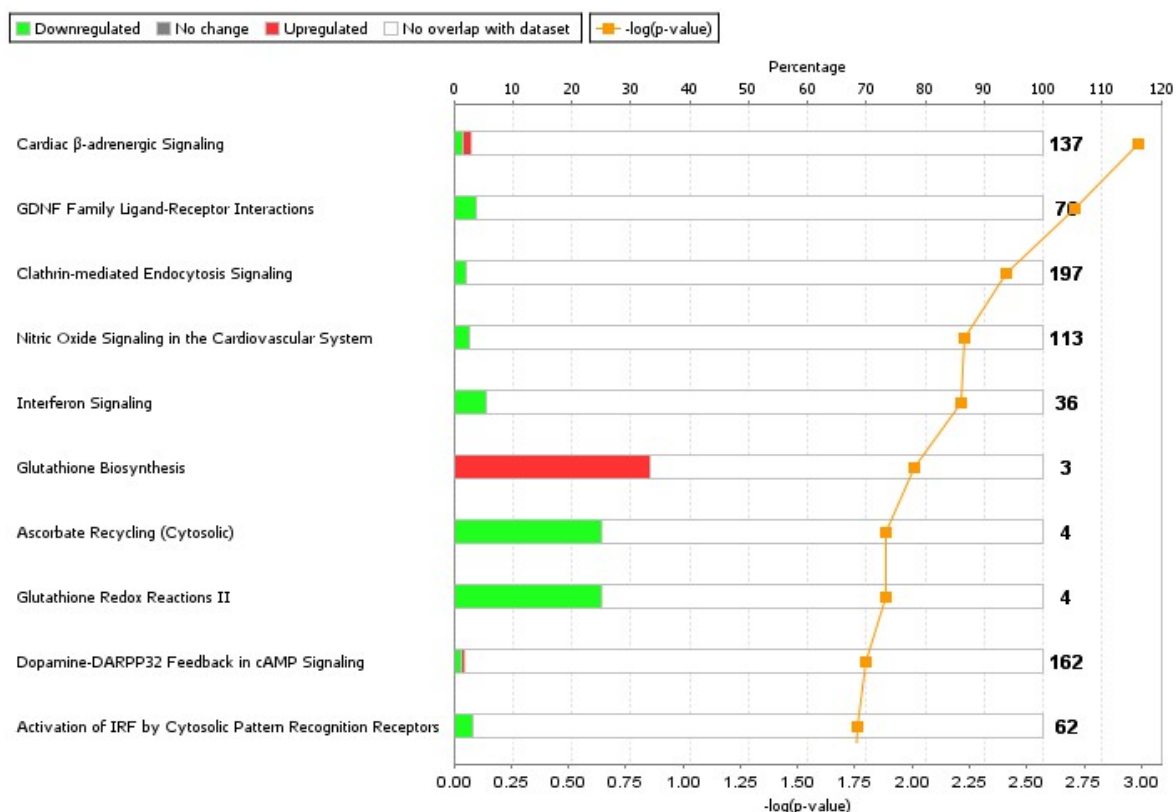
Es importante resaltar que el software IPA tiene en cuenta no solo la lista de genes sino también la magnitud en el cambio de expresión de aquellos genes expresados diferencialmente en las listas.

En la **Figura 15** se observa un resumen del análisis funcional IPA para la lista DEGs de la muestra DMPO con respecto al control donde las vías de señalamiento por óxido nítrico e interferón se encuentran enriquecidas (lista completa y comportamiento de genes en **Figura 16**).



**Figura 15: Análisis funcional (IPA) DMPO vs Ctrl DEGs: Resumen.** *Top canonical pathways* = vías de señalamiento más enriquecidas; (*Overlap* = N° de genes comprendidos en la muestra respecto del N° de genes totales en la vía). Los puntos rojos corresponden a la

distribución del *P-value* para cada vía de señalamiento; *Top upstream regulators* = predicciones de moléculas implicadas en el efecto observado junto al *P-value* y la actividad predicha (inhibida o activada). Los puntos rojos corresponden a la distribución del *P-value* de cada gen.; *Top Networks* = redes funcionales enriquecidas en la muestra DMPO con su Puntaje (*Score*) respectivo.



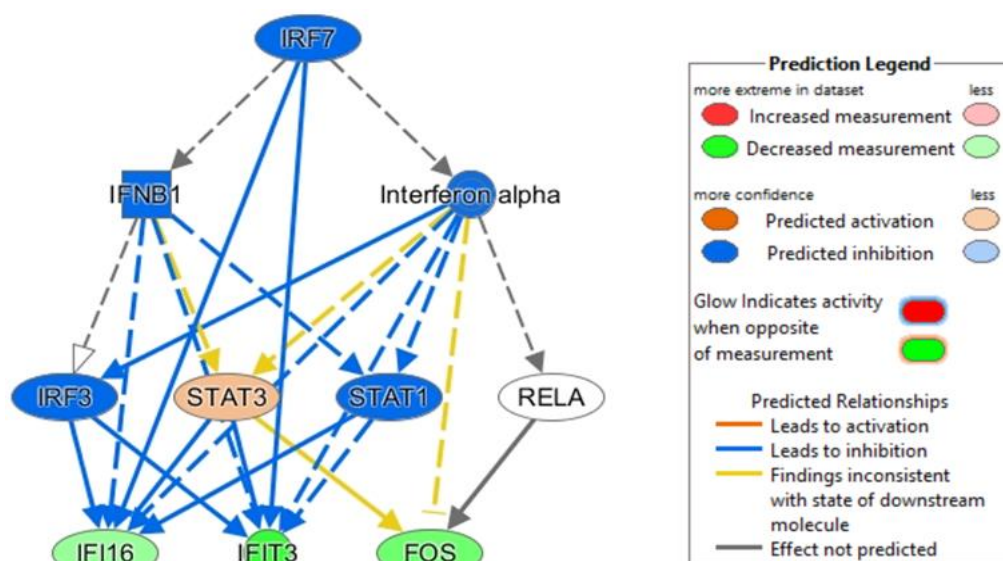
**Figura 16: Top 10 vías de señalamiento enriquecidas en la muestra DMPO:** Se muestran las 10 vías de señalamiento más enriquecidas en la muestra DMPO respecto al control con sus respectivos porcentajes de cobertura y sus *P-values*. Además el gráfico indica con colores verdes aquellos genes que se encuentran regulados a la baja en la lista y en color rojo aquellos genes que se encuentran regulados al alta. La línea naranja corresponde al comportamiento del *P-value* a lo largo de las distintas vías de señalamiento. El número de la derecha corresponde el N° total de genes contenidos en la vía de señalamiento.

Entre las vías de señalamiento enriquecidas en la muestra DMPO se pueden observar señalamiento por ON e interferón, biosíntesis de glutatión y reacciones redox. Todos los procesos relacionados se encuentran regulados a la baja a excepción de la biosíntesis del glutatión, indicando un claro efecto supresor de la transcripción en los procesos de señalamiento inflamatorio. Por otro lado, la regulación al alta de la biosíntesis de glutatión podría ser causa de efectos anti-inflamatorios.

A continuación se indican las predicciones de los factores de transcripción de respuesta al interferón 7 y 3 (IRF7 y 3; **Tabla 2 y Figura 17**) y por último se observan las redes de interacción enriquecidas, la red “*Antimicrobial response, Inflammatory response, Post-translational modifications*” se encuentra graficada en la **Figura 18**.

**Tabla 2: DMPO vs Control. Top Upstream Regulators**

| Upstream Regulator | Molecule Type           | Predicted | Activation z-score | p-value of overlap | Target molecules in dataset                                |
|--------------------|-------------------------|-----------|--------------------|--------------------|--|
| IRF7               | transcription regulator | Inhibited | -2.772             | 1.86E-10           | DHX58,IFI16,IFIT3,ISG15,Mx1/Mx2,Oasl2,PARP12,PHF11         |
| IRF3               | transcription regulator | Inhibited | -2.93              | 4.81E-10           | DHX58,EIF2AK2,IFI16,IFIT3,ISG15,Mx1/Mx2,Oasl2,PARP12,PHF11 |
| IFNAR1             | transmembrane receptor  | Inhibited | -2.219             | 8.81E-08           | EIF2AK2,IFI16,IFIT3,ISG15,Mx1/Mx2,Oasl2,PARP12             |
| IRF5               | transcription regulator | Inhibited | -2.219             | 2.66E-07           | DHX58,IFIT3,ISG15,Oasl2,PARP12                             |
| TLR3               | transmembrane receptor  | Inhibited | -2.201             | 3.98E-07           | DHX58,EIF2AK2,FOS,IFI16,IFIT3,ISG15,Mx1/Mx2,Oasl2          |
| TRIM24             | transcription regulator | Activated | 2.449              | 7.75E-07           | DHX58,IFIT3,ISG15,PARP12,PHF11,UBA7                        |
| TLR4               | transmembrane receptor  | Inhibited | -2.401             | 6.27E-06           | DAB2,IFI16,IFIT3,ISG15,METTL1,Mx1/Mx2,SLC7A11,SMPDL3B      |
| NFATC2             | transcription regulator | Inhibited | -2                 | 3.21E-05           | DAB2,IFIT3,ISG15,ITPR1,Mx1/Mx2                             |
| TLR9               | transmembrane receptor  | Inhibited | -2.415             | 3.41E-05           | IFI16,IFIT3,ISG15,Mx1/Mx2,Oasl2,SMPDL3B                    |
| STAT1              | transcription regulator | Inhibited | -2.407             | 8.06E-05           | EIF2AK2,IFI16,IFIT3,ISG15,Mx1/Mx2,RNF213                   |



**Figura 17: Predicciones realizadas sobre posibles moléculas reguladoras del efecto observado en DMPO vs Control:** La tabla 2 lista los DEGs responsables de la predicción junto a su cambio de expresión (*Expression Fold Change*) y su rol respecto de los reguladores predichos (Activado o inhibido). Se grafica la red de interacción existente entre las moléculas predichas de ser reguladoras (azul) y los DEGs en DMPO respecto al control. Los mismos



Entre los genes listados en la **tabla 2** se encuentran factores de transcripción relacionados a la respuesta inmune como IRF 3 y 7, STAT1 y diferentes receptores relacionados a sistema inmune innato como TLRs y TRIM. Es importante señalar que la predicción realizada por el software indica que todos los genes listados se encontrarían inhibidos en la muestra DMPO, lo que indica un fuerte efecto supresor de la transcripción por parte del espin trap a 6 horas de su agregado.

### **Conclusiones del estudio de los efectos de DMPO sobre el transcriptoma de macrófagos en reposo**

Los resultados del análisis funcional utilizando la base de datos DAVID y el software IPA sorprendentemente indican que los efectos de DMPO por sí solo en el transcriptoma de macrófagos en reposo están relacionados a la regulación negativa de los procesos inmunes en particular al señalamiento por interferón y receptores tipo Toll.

#### **2.1.B: Estudio de los efectos de LPS sobre el transcriptoma de macrófagos**

Con el propósito de determinar los genes asociados con la activación inflamatoria de macrófagos por LPS se realizó el análisis funcional de los DEGs en la comparación LPS vs Control. Cabe resaltar que la lista comprende 10 veces más genes que la comparación DMPO vs Control con 950 DEGs de los cuales 407 se encuentran regulados a la baja y 543 al alta, esto permitió la búsqueda de vías de señalamiento enriquecidas comprendidas en las listas de la Enciclopedia Genómica de Kyoto (KEGG-<http://www.genome.jp/kegg/>).

Al igual que en la sección previa, se utilizó la base de datos DAVID y el software IPA en búsqueda de identificar funciones biológicas (GO terms) como así también reguladores “*upstream*”. En esta comparación se adicionó el análisis de vías de señalamiento enriquecidas (*KEGG pathways*). Las **Tablas 3 y 4** muestran las funciones biológicas y vías de señalamiento enriquecidas, respectivamente.

**Tabla 3: LPS vs Control DEGs: Funciones biológicas enriquecidas**

| Funciones biológicas enriquecidas (GO term)   | Count | %    | PValue   | Genes  |
|---|-------|------|----------|--|
| Inflammatory response                         | 14    | 20.0 | 2.81E-10 | NFKBIZ, CCL3, CCL2, TNF, LY86, CXCL2, CCL9, CCL4, CCL7, CXCL10, IFI202B, SLC11A1, IL1B, CD14 |
| Chromatin silencing                           | 8     | 11.4 | 2.93E-09 | HIST1H2AF, HIST1H2AD, HIST2H2AC, HIST1H2AI, H2AFZ, HIST1H2AK, HIST1H2AO, HIST1H2AN           |
| Response to virus                             | 8     | 11.4 | 2.26E-08 | IFIT3, IFIT2, ODC1, TNF, OASL2, OASL1, EEF1G, CXCL10   |
| Chemokine-mediated signaling pathway          | 7     | 10.0 | 4.72E-08 | CCL3, CCL2, CXCL2, CCL9, CCL4, CCL7, CXCL10  |
| Immune response                               | 11    | 15.7 | 5.06E-08 | CCL3, CCL2, TNF, OASL2, CXCL2, OASL1, CCL9, IL1B, CCL4, CCL7, CXCL10                         |
| Neutrophil chemotaxis                         | 7     | 10.0 | 1.88E-07 | CCL3, CCL2, CXCL2, CCL9, IL1B, CCL4, CCL7  |
| Positive regulation of inflammatory response  | 6     | 8.6  | 3.31E-06 | CCL3, CCL2, TNF, CCL9, CCL4, CCL7  |
| Chemotaxis                                    | 7     | 10.0 | 4.49E-06 | CCL3, CCL2, CXCL2, CCL9, CCL4, CCL7, CXCL10  |
| Lipopolysaccharide-mediated signaling pathway | 5     | 7.1  | 4.73E-06 | CCL3, CCL2, TNF, IL1B, CD14  |
| Cellular response to interferon-gamma         | 6     | 8.6  | 4.85E-06 | CCL3, CCL2, CCL9, GBP3, CCL4, CCL7   |

**Tabla 4: LPS vs Control DEGs: Enriched KEGG Pathways**

| Enriched KEGG Pathways                  | Count | %    | PValue   | Genes   |
|---|-------|------|----------|---|
| TNF signaling pathway                   | 25    | 3.70 | 5.28E-11 | TRAF1, CSF2, IL6, CEBPB, TNF, CCL2, PTGS2, SOCS3, MMP9, CXCL2, EDN1, IFI47, CREB5, IL15, CCL5, CXCL10, MAPK1, TNFRSF1B, ATF4, CASP8, MAP3K8, BCL3, IL1B, MLKL, FAS        |
| Influenza A                             | 26    | 3.85 | 1.48E-07 | CCL2, TNF, IL18, OAS3, TLR3, RSAD2, CCL5, IVNS1ABP, CXCL10, IL1B, FAS, CASP1, MX2, IL1A, IL6, SOCS3, FURIN, STAT2, DDX58, MAPK1, IKBKE, TNFSF10, IFNB1, IRF7, OAS1G, ADAR |
| Cell cycle                              | 21    | 3.11 | 5.44E-07 | FZR1, ANAPC5, TTK, CDC20, ESPL1, CDC25C, MCM5, RBX1, CCNB1, CDKN1A, MAD2L1, CDKN2C, CCND2, PLK1, MDM2, BUB1B, SMC1A, GADD45B, CCNA2, GADD45A, TFDPI                       |
| Cytosolic DNA-sensing pathway           | 15    | 2.22 | 6.54E-07 | IL6, IL18, TREX1, CCL5, CCL4, CXCL10, DDX58, IFI202B, IKBKE, IFNB1, IRF7, IL1B, CASP1, ZBP1, ADAR   |
| p53 signaling pathway                   | 14    | 2.07 | 6.84E-06 | IGF1, SESN2, CCNG2, SESN1, GTSE1, CCNB1, PPM1D, CDKN1A, CCND2, CASP8, MDM2, FAS, GADD45B, GADD45A   |
| Herpes simplex infection                | 25    | 3.70 | 1.86E-05 | TRAF1, IL6, TNF, SP100, CCL2, SOCS3, OAS3, TLR3, IL15, CCL5, DAXX, STAT2, DDX58, IKBKE, GTF2I, IFNB1, IRF7, TAP1, CASP8, IL1B, PER1, H2-T10, FAS, OAS1G, PILRA            |
| Toll-like receptor signaling pathway    | 16    | 2.37 | 3.99E-05 | CCL3, IL6, TNF, TLR3, CD40, CCL5, CCL4, CXCL10, MAPK1, IKBKE, IFNB1, IRF7, MAP3K8, CASP8, IL1B, CD14  |
| Transcriptional misregulation in cancer | 21    | 3.11 | 5.03E-05 | TRAF1, CSF2, NFKBIZ, IL6, CEBPB, MMP9, IGF1, BCL2L1, CD40, FCGR1, DDIT3, BCL2A1D, CDKN1A, BCL2A1C, NUPR1, REL, CDKN2C, CCND2, LYL1, MDM2, CD14                            |
| DNA replication                         | 9     | 1.33 | 1.24E-04 | RPA1, RFC5, RFC1, POLD1, LIG1, PRIM2, FEN1, MCM5, RNASEH2C  |
| NOD-like receptor signaling pathway     | 11    | 1.63 | 1.66E-04 | MAPK1, IL6, CCL2, TNF, IL18, CASP8, PSTPIP1, IL1B, RIPK2, CCL5, CASP1   |

**Tablas 3 y 4: LPS vs Control DEGs: Funciones biológicas y vías de señalamiento enriquecidas respectivamente.** La tabla se encuentra compuestas por: “GO term” a las funciones biológicas enriquecidas por los genes presentes en la muestra (Tabla 3) o “*Enriched KEGG Pathways*” correspondiente a las vías de señalamiento enriquecidas por los genes presentes en la muestra (Tabla 4) ; “*Count*” correspondiente al número de genes



responsables del “enriquecimiento”; “%” correspondiente al porcentaje de genes presentes en la muestra respecto al total de genes presente en la lista de ontología génica; “P value” correspondiente a la significancia estadística del enriquecimiento; “Genes” correspondiente a los símbolos de los genes comprendidos en las muestras contenidos en las listas de GO.

Los resultados presentes en las Tablas 3 y 4 indican que el efecto de LPS se encuentra relacionado a funciones biológicas relacionadas al sistema inmune pero en contraste al DMPO, LPS “enriquece” funciones de regulación positiva de los procesos inmunes (respuesta inflamatoria como lista más enriquecida) con una clara presencia de citocinas proinflamatorias como CCL2, TNF- $\alpha$  e IL-1B.

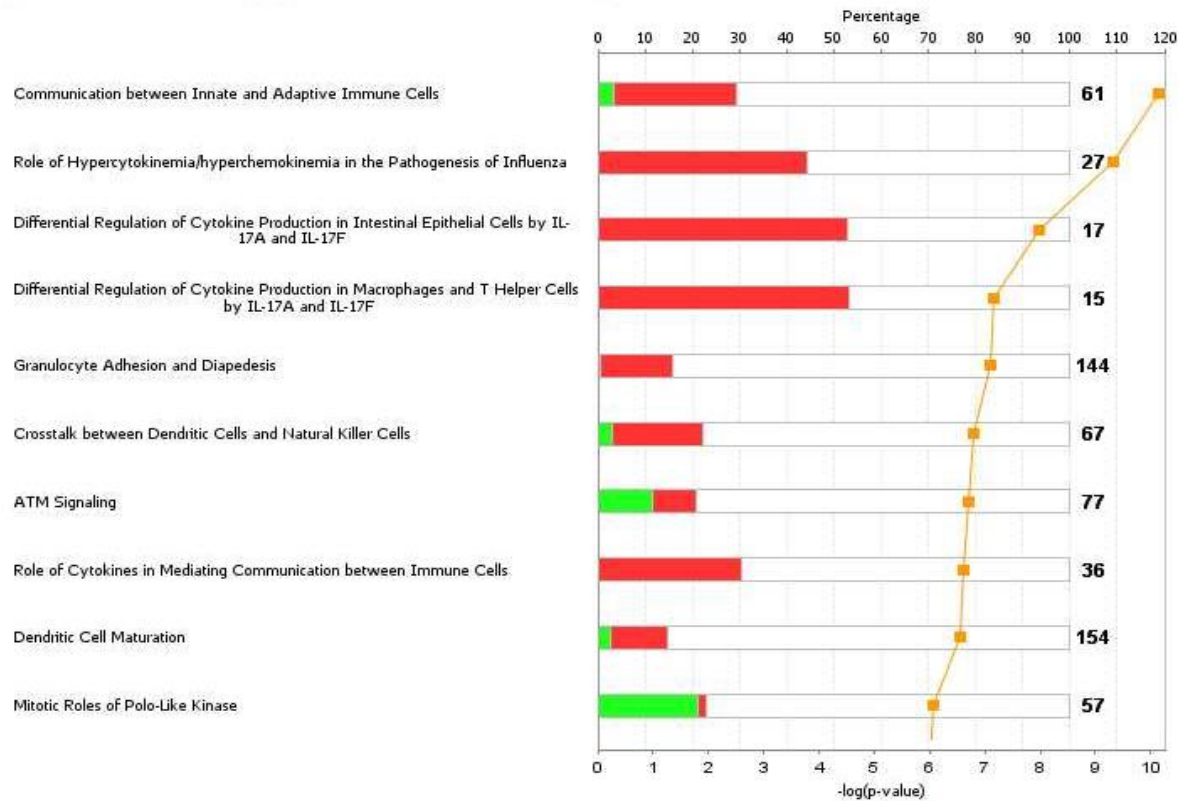
A continuación, la **Figura 19** contiene el resumen del análisis IPA donde se puede observar las vías de señalamiento enriquecidas (*Top Canonical Pathways*) entre las que se encuentra “Comunicación entre el sistema inmune innato y adaptivo”, la lista completa y el comportamiento de los genes comprendidos en ellas se puede observar en la **Figura 20**.

| Top Canonical Pathways  |       |                    |                      |
|---|-------|--------------------|----------------------|
| Name  |       | p-value            | Overlap              |
| Communication between Innate and Adaptive Immune Cells  |       | 7.07E-11           | 29.5 % 18/61         |
| Role of Hypercytokinemia/hyperchemokineemia in the Pathogenesis of Influenza                          |       | 4.65E-10           | 44.4 % 12/27         |
| Differential Regulation of Cytokine Production in Intestinal Epithelial Cells by IL-17A and IL-17F    |       | 1.06E-08           | 52.9 % 9/17          |
| Differential Regulation of Cytokine Production in Macrophages and T Helper Cells by IL-17A and IL-17F |       | 6.71E-08           | 53.3 % 8/15          |
| Granulocyte Adhesion and Diapedesis   |       | 7.95E-08           | 16.0 % 23/144        |
| 1 2 3 4 5 6 7 8 9 >   |       |                    |                      |
| Top Upstream Regulators   |       |                    |                      |
| Upstream Regulator  |       | p-value of overlap | Predicted Activation |
| TLR3  |       | 4.13E-46           | Activated            |
| IRF3  |       | 1.30E-43           | Activated            |
| TLR4  |       | 3.20E-42           | Activated            |
| IFNG  |       | 9.24E-40           | Activated            |
| TICAM1  |       | 7.24E-38           | Activated            |
| 1 2 3 4 5 6 7 8 9 >   |       |                    |                      |
| Top Networks  |       |                    |                      |
| ID Associated Network Functions   | Score |                    |                      |
| 1 Cellular Function and Maintenance, Immunological Disease, Inflammatory Response                     | 34    |                    |                      |
| 2 Cellular Compromise, Cellular Function and Maintenance, Lipid Metabolism                            | 34    |                    |                      |
| 3 Cell Cycle, Cellular Assembly and Organization, DNA Replication, Recombination, and Repair          | 34    |                    |                      |
| 4 Cell Cycle, Cellular Assembly and Organization, DNA Replication, Recombination, and Repair          | 32    |                    |                      |
| 5 Inflammatory Response, Gastrointestinal Disease, Organismal Injury and Abnormalities                | 32    |                    |                      |



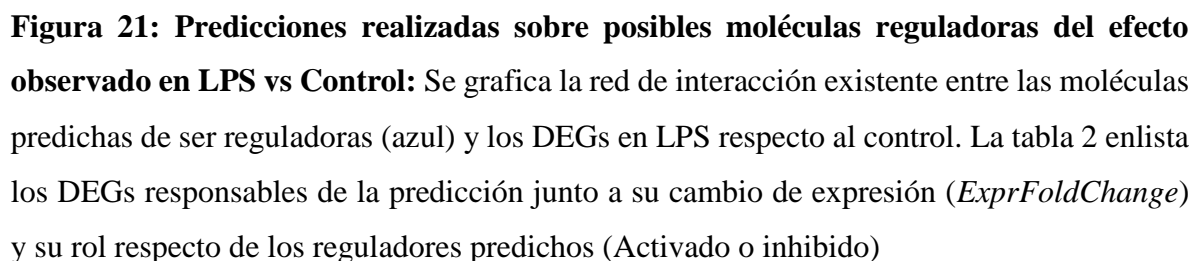
**Figura 19: Análisis funcional (IPA) LPS vs Ctrl DEGs: Resumen.** *Top canonical pathways* = vías de señalamiento más enriquecidas; (*Overlap* = N° de genes comprendidos en la muestra respecto del N° de genes totales en la vía). Los puntos rojos corresponde a la distribución del P-value para cada vía de señalamiento; **Top upstream regulators** = predicciones de moléculas implicadas en el efecto observado junto al P-value y la actividad predicha (inhibida o activada). Los puntos rojos corresponden a la distribución del P-value de cada gen.; **Top Networks** = redes funcionales enriquecidas en la muestra DMPO con su Puntaje (Score) respectivo.

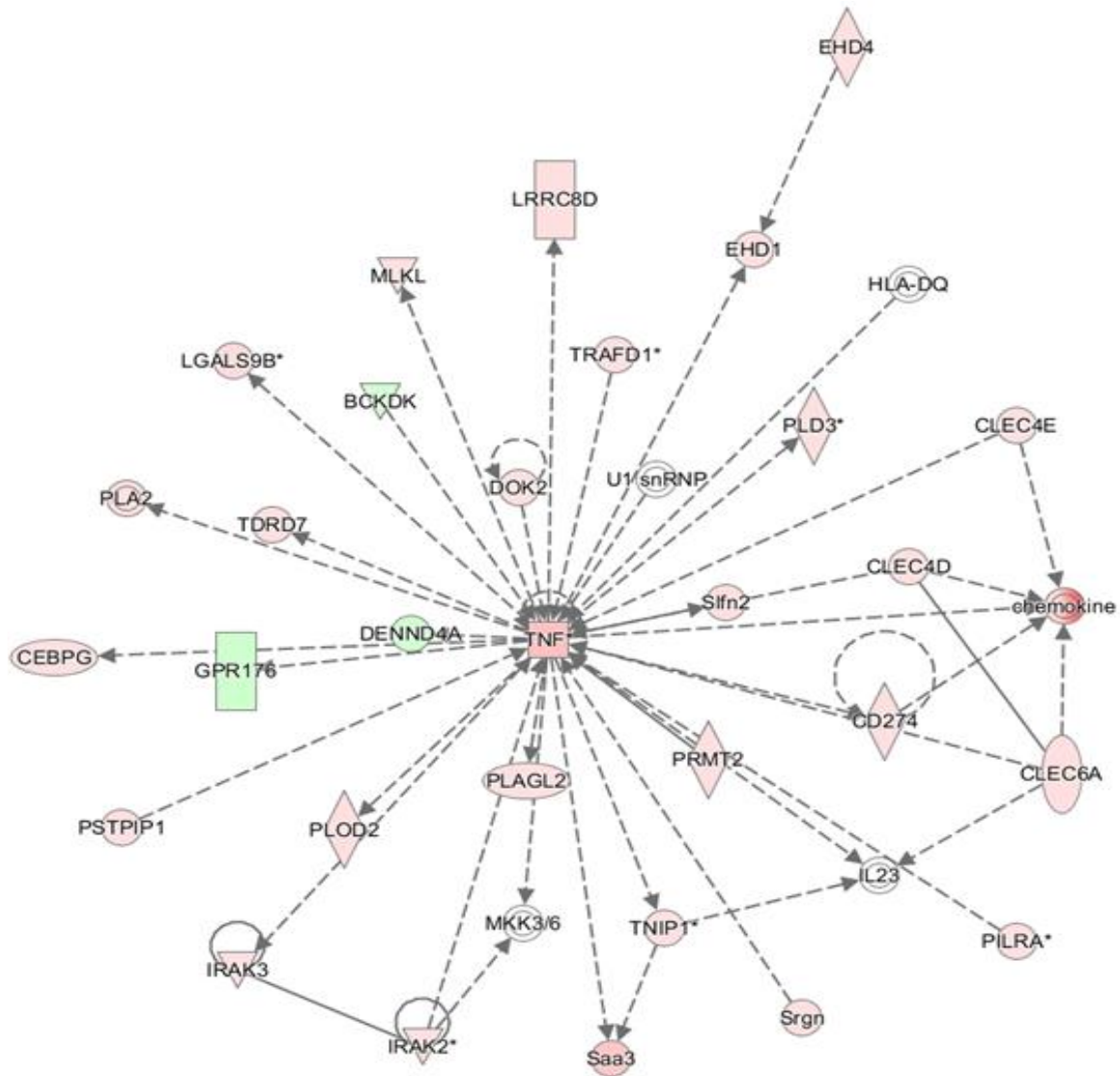
Además se puede observar que TLR-3 y TLR-4 se encuentran entre las predicciones realizadas por el software como receptores activados por el LPS, la lista completa se encuentra en la **Tabla 5**. Por otro lado, la **Figura 21** muestra la interacción de TLR-4 con las moléculas contribuyentes a la predicción. Por último, se enlistan las redes de interacción enriquecidas entre las que se encuentra “*Antimicrobial Response, Inflammatory Response, Post-Translational Modification*”, la misma se encuentra representada gráficamente en la **Figura 22**.



**Figura 20: Top 10 vías de señalamiento enriquecidas en la muestra LPS:** Se muestran las 10 vías de señalamiento más enriquecidas en la muestra LPS respecto al control con sus respectivos porcentajes de cobertura y sus P-values. Además el gráfico indica con colores verdes aquellos genes que se encuentran regulados a la baja en la lista y en color rojo aquellos genes que se encuentran regulados al alta. La línea naranja corresponde al comportamiento del P-value a lo largo de las distintas vías de señalamiento. El número a la derecha corresponde el N° total de genes contenidos en la vía de señalamiento.

| Upstream Regulator | Molecule Type              | Predicted Activation State | Activation z-score | p-value of overlap |
|--------------------|----------------------------|----------------------------|--------------------|--------------------|
| TLR3               | transmembrane receptor     | Activated                  | 7.196              | 4.13E-46           |
| IRF3               | transcription regulator    | Activated                  | 6.201              | 1.30E-43           |
| TLR4               | transmembrane receptor     | Activated                  | 7.122              | 3.20E-42           |
| IFNG               | cytokine                   | Activated                  | 8.957              | 9.24E-40           |
| TICAM1             | other                      | Activated                  | 6.209              | 7.24E-38           |
| IRF7               | transcription regulator    | Activated                  | 6.014              | 3.71E-37           |
| STAT1              | transcription regulator    | Activated                  | 6.05               | 1.32E-35           |
| TLR9               | transmembrane receptor     | Activated                  | 7.309              | 4.55E-35           |
| IFNAR1             | transmembrane receptor     | Activated                  | 3.598              | 3.53E-34           |
| PTGER4             | g-protein coupled receptor | Inhibited                  | -5.736             | 2.34E-30           |





**Figura 22: Red de interacción enriquecida en la muestra DMPO “Antimicrobial Response, Inflammatory Response, Post-Translational Modification”. Red de interacción funcional enriquecida en la muestra LPS respecto al control. En verde se pueden observar aquellos genes cuya expresión es menor en LPS respecto al control mientras que en rojo se observan aquellos genes cuya expresión es mayor en LPS respecto al control. Las líneas sólidas indican relaciones directas entre las proteínas mientras que las líneas punteadas relaciones indirectas. Se gráfica el factor de necrosis tumoral- $\alpha$  (TNF- $\alpha$ ) en el centro del**

gráfico como molécula principal en la red de interacción. Leyenda completa en la Figura suplementaria 1 del Anexo I

### **Conclusiones del estudio de los efectos de LPS sobre el transcriptoma de macrófagos**

Los resultados expuestos previamente del análisis funcional realizado utilizando la base de datos DAVID y el software IPA sobre la lista de DEGs en la comparación LPS vs control son consistentes con información publicada [97].

#### **2.1.c: Estudio de los efectos de DMPO sobre el transcriptoma de macrófagos estimulados con LPS**

En el estudio transcriptómico de los efectos de DMPO y LPS por separado fue posible observar que en ambas condiciones las funciones biológicas enriquecidas estaban relacionadas al sistema inmune principalmente pero, en algunos casos de manera antagónica. A continuación estudiamos los efectos de DMPO sobre el transcriptoma de macrófagos estimulados con LPS utilizando el mismo enfoque de análisis funcional.

Cabe destacar que la lista de DEGs proveniente de la comparación DMPO+LPS vs LPS comprende 215 genes de los cuales un 75% se encuentra regulado a la baja, indicando un claro efecto de inhibición de la transcripción por parte de DMPO.

En primer lugar se realizó la búsqueda de funciones biológicas y vías de señalamiento enriquecidas utilizando la base de datos DAVID. Los resultados son mostrados en las **Tablas 6 y 7** respectivamente.

**Tabla 6: DMPO+LPS vs LPS DEGs: Funciones biológicas enriquecidas (GO term)**

| Enriched Gene Ontology (GO) Term        | Count | %    | PValue   | Genes  |
|---|-------|------|----------|--|
| Cellular response to lipopolysaccharide | 16    | 10.4 | 9.02E-11 | CSF3, HAVCR2, CSF2, IL6, CCL2, TNF, IL18, CXCL2, AXL, FCGR4, CD40, CXCL10, LCN2, IRF8, NOS2, GBP2                      |
| Inflammatory response                   | 19    | 12.3 | 2.00E-10 | HAVCR2, NFKBIZ, IL6, CCL2, TNF, PTGS2, NFKBID, IL27, IL18, CXCL2, AXL, CCL9, FPR2, CD40, CCL7, CXCL10, IL1B, FAS, NOS2 |
| Response to virus                       | 10    | 6.5  | 1.85E-08 | LCN2, IFIT3, IFIT2, TNF, OASL2, OASL1, BCL3, MX2, ISG20, CXCL10  |
| Immune response                         | 15    | 9.7  | 2.86E-08 | CSF3, CSF2, IL6, CCL2, TNF, IL18, CXCL2, CCL9, CCL7, CXCL10, OASL2, IRF8, OASL1, IL1B, FAS                             |
| Immune system process                   | 17    | 11.0 | 5.21E-08 | HAVCR2, CFB, IL27, AXL, PTPN22, SAMHD1, CD40, FCGR1, ISG20, IFIT3, LCN2, IFIT2, OASL2, IRF7, TAP1, OASL1, MX2          |
| Defense response to virus               | 11    | 7.1  | 7.52E-07 | IFIT3, IFIT2, IL6, IFNB1, OASL2, OASL1, SAMHD1, CD40, MX2, ISG20, CXCL10   |
| Cellular response to interferon-gamma   | 8     | 5.2  | 9.84E-07 | CCL2, EDN1, CCL9, SYNCRIP, NOS2, GBP3, GBP2, CCL7  |
| Innate immune response                  | 15    | 9.7  | 3.03E-06 | HAVCR2, CFB, IL27, AXL, SAMHD1, FCGR1, ISG20, IFIT3, LCN2, IFIT2, IFNB1, OASL2, IRF7, OASL1, MX2                       |
| Defense response to protozoan           | 6     | 3.9  | 3.27E-06 | IL6, IRF8, BCL3, CD40, GBP3, GBP2  |
| Response to lipopolysaccharide          | 11    | 7.1  | 3.36E-06 | TNF, PTGS2, CXCL2, EDN1, IL1B, PTPN22, NOS2, FAS, CD40, GCH1, CXCL10   |

**Tabla 7: DMPO+LPS vs LPS DEGs: Vías de señalamiento enriquecidas (KEGG pathways)**

| Enriched KEGG Pathway                     | Count | %   | PValue     | Genes  |
|---|-------|-----|------------|--|
| TNF signaling pathway                     | 13    | 8.4 | 4.96E-10   | CSF2, IL6, CCL2, TNF, PTGS2, MMP9, EDN1, CXCL2, IFI47, CXCL10, BCL3, IL1B, FAS |
| Cytokine-cytokine receptor interaction    | 13    | 8.4 | 4.08E-06   | CSF3, VEGFC, CSF2, IL6, TNF, CCL2, IFNB1, IL18, IL1B, FAS, CD40, CCL7, CXCL10  |
| Hematopoietic cell lineage                | 8     | 5.2 | 1.67E-05   | CSF3, CSF2, IL6, TNF, CD44, CD33, IL1B, FCGR1                                  |
| Cytosolic DNA-sensing pathway             | 6     | 3.9 | 3.93E-04   | IL6, IFNB1, IRF7, IL18, IL1B, CXCL10   |
| Toll-like receptor signaling pathway      | 7     | 4.5 | 4.51E-04   | IL6, TNF, IFNB1, IRF7, IL1B, CD40, CXCL10                                      |
| Transcriptional misregulation in cancer   | 8     | 5.2 | 0.00117749 | CSF2, NFKBIZ, IL6, CDKN2C, MMP9, CD40, FCGR1, DDIT3                            |
| Natural killer cell mediated cytotoxicity | 5     | 3.2 | 0.01962618 | CSF2, TNF, IFNB1, FCGR4, FAS   |
| RIG-I-like receptor signaling pathway     | 4     | 2.6 | 0.02910377 | TNF, IFNB1, IRF7, CXCL10   |
| Osteoclast differentiation                | 5     | 3.2 | 0.03526152 | TNF, IFNB1, FCGR4, IL1B, FCGR1   |
| MAPK signaling pathway                    | 7     | 4.5 | 0.03785582 | TNF, MKNK2, IL1B, FAS, DAXX, DDIT3, DUSP6                                      |

**Tabla 6 y 7: DMPO+LPS vs LPS DEGs: Funciones biológicas y vías de señalamiento enriquecidas.** “GO term”: en **tabla 6** corresponde a funciones biológicas enriquecidas por los genes presentes en la muestra; “**Enriched KEGG Pathways**” en **tabla 7** correspondiente a las vías de señalamiento enriquecidas por los genes presentes en la muestra; “**Count**”: número de genes responsables de el “enriquecimiento”; “**%**”: porcentaje de genes presentes en la muestra respecto al total de genes presente en la lista; “**P value**”: significancia

estadística del enriquecimiento; **“Genes”**: símbolos de los genes comprendidos en las muestras contenidos en las listas de GO.

Los resultados indican que los genes afectados por DMPO en células estimuladas por LPS se encuentran relacionados tanto a la respuesta al LPS como también a la respuesta a IFN- $\beta$  y a virus entre otras funciones celulares. De manera similar, estos genes se asocian a las vías de señalamiento por TNF- $\alpha$ , TLRs y MAPK quinasas. Esta información es consistente con DMPO interfiriendo distintas vías de señalización gatilladas por LPS [42].

A continuación analizamos el análisis utilizando el software IPA. En la **Figura 23** se observan la vía de señalamiento enriquecida relacionada a la comunicación entre células del sistema inmune (**Figura 24**), distintos TLRs (3; 4 y 9) como reguladores *“upstream”* (**ver Tabla 8 y Figura 25**), y la red de interacción enriquecida relacionada a enfermedades infecciosas y respuesta inflamatoria (**Figura 26**)

| Top Canonical Pathways  |          |              |
|---|----------|--------------|
| Name  | p-value  | Overlap      |
| Role of Cytokines in Mediating Communication between Immune Cells                                     | 2.86E-11 | 24.3 % 9/37  |
| Role of Hypercytokinemia/hyperchemokineemia in the Pathogenesis of Influenza                          | 8.97E-11 | 28.6 % 8/28  |
| Granulocyte Adhesion and Diapedesis   | 9.39E-11 | 9.2 % 14/153 |
| Communication between Innate and Adaptive Immune Cells  | 5.20E-10 | 14.5 % 10/69 |
| Differential Regulation of Cytokine Production in Macrophages and T Helper Cells by IL-17A and IL-17F | 2.14E-09 | 40.0 % 6/15  |

| Top Upstream Regulators |                    |                      |
|-------------------------|--------------------|----------------------|
| Upstream Regulator      | p-value of overlap | Predicted Activation |
| TLR3                    | 7.84E-37           | Inhibited            |
| TLR4                    | 1.23E-35           | Inhibited            |
| TLR9                    | 6.43E-33           | Inhibited            |
| TICAM1                  | 7.73E-32           | Inhibited            |
| STAT1                   | 5.78E-31           | Inhibited            |

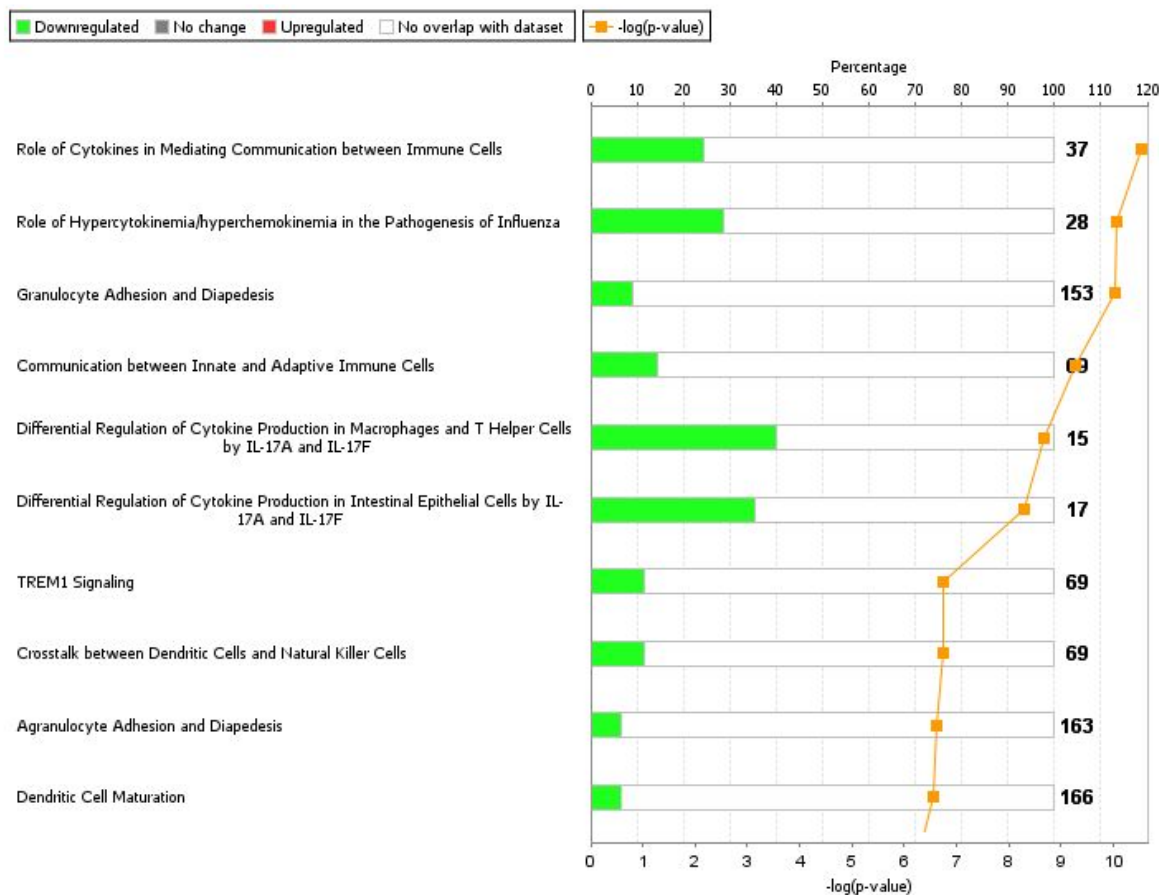
  

| Top Networks  |       |
|---|-------|
| ID Associated Network Functions   | Score |
| 1 Hematological System Development and Function, Tissue Development, Immune Cell Trafficking          | 36    |
| 2 Infectious Diseases, Gastrointestinal Disease, Inflammatory Disease                                 | 36    |
| 3 Cellular Function and Maintenance, Hematological System Development and Function, Tissue Morphology | 27    |
| 4 Connective Tissue Development and Function, Tissue Morphology, Carbohydrate Metabolism              | 21    |
| 5 Cell-mediated Immune Response, Cellular Movement, Hematological System Development and Function     | 20    |

**Figura 23: Análisis funcional (IPA) DMPO+LPS vs LPS DEGs: Resumen.** *Top canonical pathways* = vías de señalamiento más enriquecidas; (Overlap = N° de genes comprendidos en la muestra respecto del N° de genes totales en la vía). Los puntos rojos corresponde a la distribución del P-value para cada vía de señalamiento; *Top upstream regulators* = predicciones de moléculas implicadas en el efecto observado junto al P-value y la actividad predicha (inhibida o activada). Los puntos rojos corresponden a la distribución del P-value de cada gen.; *Top Networks* = redes funcionales enriquecidas en la muestra DMPO con su Puntaje (Score) respectivo.

Es importante remarcar que la mayoría de los reguladores “*upstream*” están predichos como inhibiciones, lo que sugiere que DMPO interfiere de manera generalizada en el señalamiento gatillado por LPS a través de TLRs. Se puede observar en la **Figura 25** la presencia en color verde de los genes CCL2, CCL7, IRF7 y CD40 indicando la regulación a la baja de sus ARN mensajeros en la muestra DMPO+LPS respecto a la condición estimulado con LPS. Dichos genes se encuentran relacionados a la respuesta inflamatoria de macrófagos siendo CCL2 y CCL7 proteínas quimioattractantes, IRF7 un factor de transcripción inflamatorio y CD40 una molécula co-estimuladora necesaria para comunicación entre células del sistema inmune innato y adaptativo.





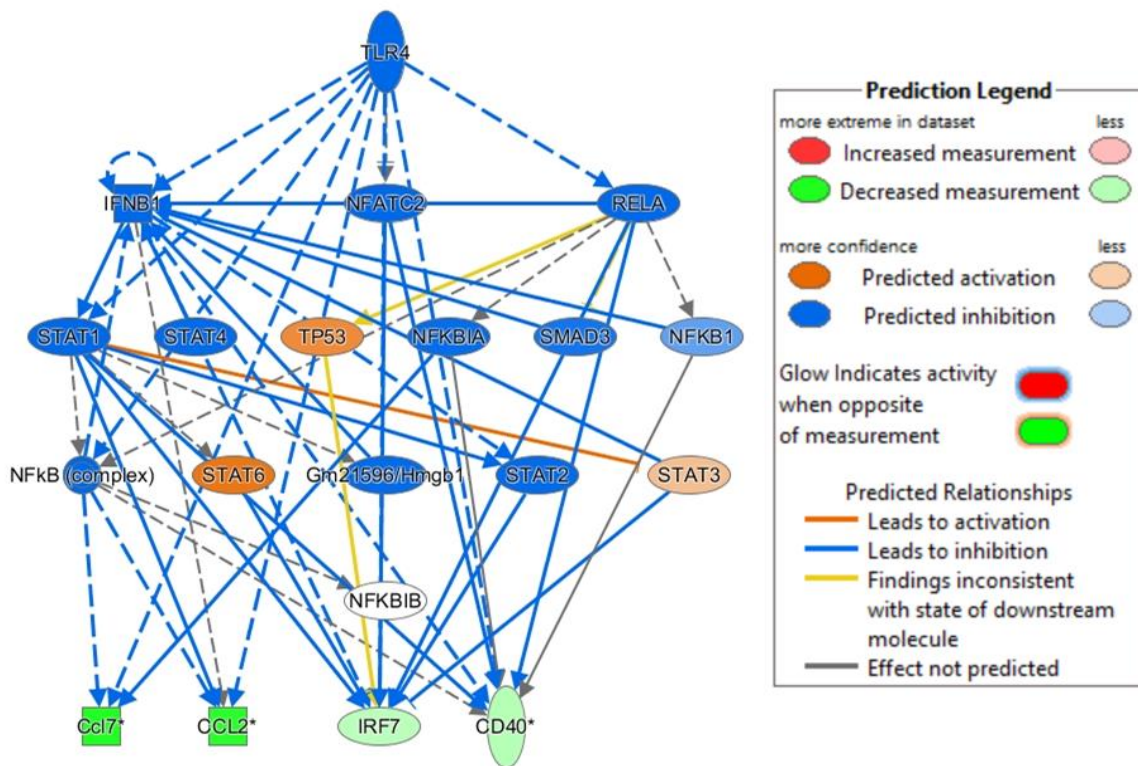
**Figura 24: Top 10 vías de señalamiento enriquecidas en la muestra DMPO+LPS:** Se muestran las 10 vías de señalamiento más enriquecidas en la muestra DMPO+LPS respecto a la muestra estimulada con LPS, con sus respectivos porcentajes de cobertura y sus P-values. Además el gráfico indica con colores verdes aquellos genes que se encuentran regulados a la baja en la lista y en color rojo aquellos genes que se encuentran regulados al alta. La línea naranja corresponde al comportamiento del P-value a lo largo de las distintas vías de señalamiento. El número a la derecha corresponde el N° total de genes contenidos en la vía de señalamiento.

Entre las vías de señalamiento enriquecidas en la muestra DMPO+LPS se puede observar que todos los procesos se encuentran relacionado al sistema inmune e inhibidos respecto de la condición LPS. Los resultados indican que DMPO ejerce su efecto anti-

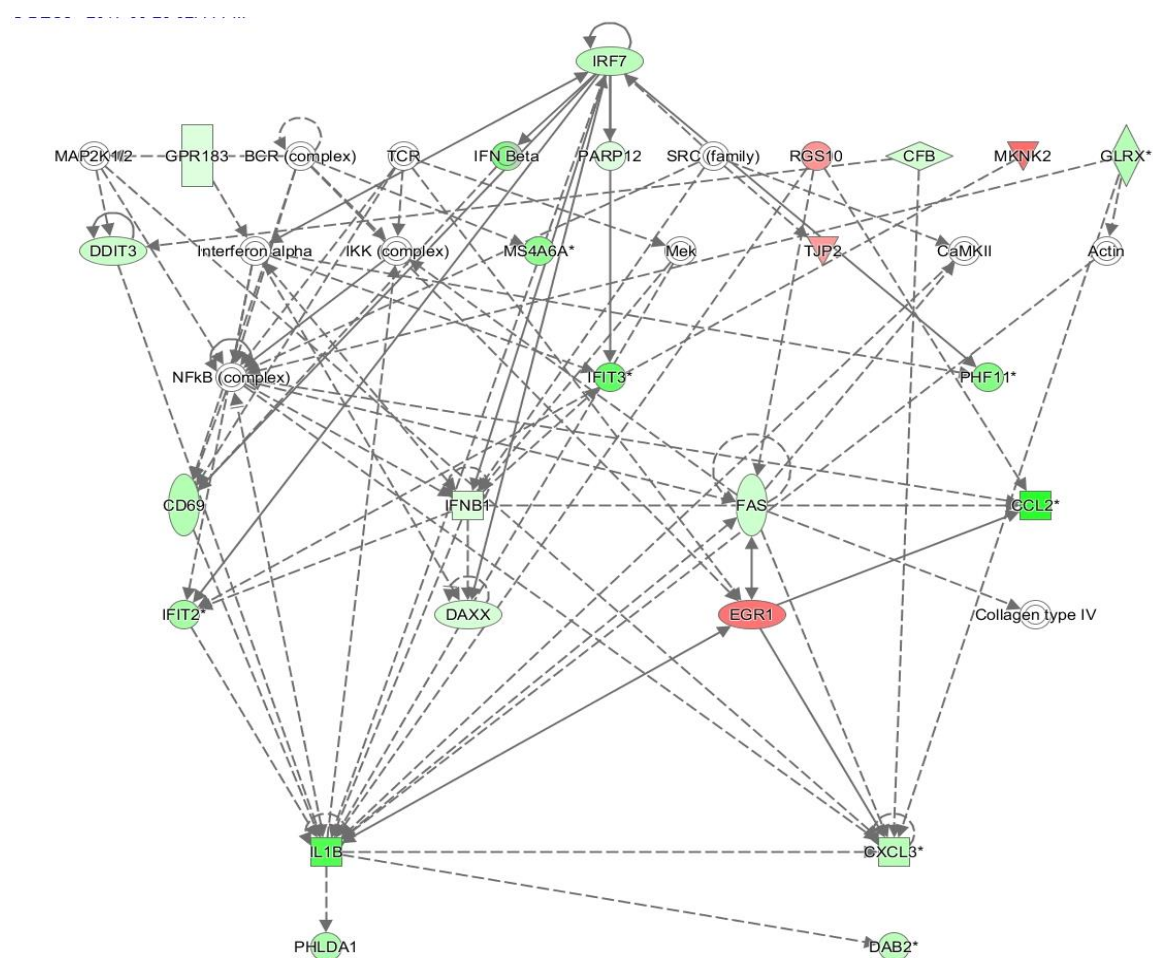
inflamatorio en múltiples funciones celulares como la comunicación entre células del sistema inmune y la adhesión de granulocitos.

**Tabla 6: DMPO+LPS vs LPS. Top Upstream Regulators**

| Upstream Regulator | Molecule Type              | Predicted Activation State | Activation z-score | p-value of overlap | Target molecules in dataset  |
|--------------------|----------------------------|----------------------------|--------------------|--------------------|--|
| TLR3               | transmembrane receptor     | Inhibited                  | -5.577             | 7.84E-37           | BCAR3,Ccl2,Ccl7,CD40,CD69,CSF2,CSF3,CXCL10,CXCL3,EDN1,FAS,GBP2,GBP3,GBP4,GCH1,IFI16,IFIT2,IFIT3,IFNB1,IL18,IL6                   |
| TLR4               | transmembrane receptor     | Inhibited                  | -5.296             | 1.23E-35           | Ccl2,CCL2,Ccl7,CD40,CFB,CSF2,CSF3,CXCL10,CXCL3,DAB2,DAXX,EDN1,FAS,GBP2,HDC,IFI16,IFI47,IFIT2,IFIT3,IFNB1,IL18,IL1B,IL27,IL6,IRF7 |
| TLR9               | transmembrane receptor     | Inhibited                  | -5.415             | 6.43E-33           | Ccl2,Ccl7,CD40,CD69,CSF2,CSF3,CXCL10,CXCL3,EDN1,EGR1,FAS,GC  |
| TICAM1             | other                      | Inhibited                  | -4.782             | 7.73E-32           | H1,IFI16,IFIT2,IFIT3,IFNB1,IL18,IL1B,IL6,IRF7  |
| STAT1              | transcription regulator    | Inhibited                  | -5.025             | 5.78E-31           | BCL3,Ccl2,CCL2,CD40,CFB,CXCL10,CXCL3,EGR1,ETS2,FAS,FPR2,IFI16,IFI47,IFIT2,IFIT3,IFNB1,IL18,IL1B,IL6,IRF7,ISG20,Mx1/Mx2,NFKBIZ    |
| IRF3               | transcription regulator    | Inhibited                  | -3.506             | 1.60E-28           | AXL,Ccl2,CCL2,CD40,CSF2,CXCL10,CXCL3,EGR1,FAS,GBP2,GBP3,IFI16,IFI47,IFIT2,IFIT3,IFNB1,IL18,IL1B,IL6,IRF7,IRF8,LCN2,Mx1/Mx2,NOS2  |
| IFNAR1             | transmembrane receptor     | Inhibited                  | -2.458             | 5.68E-28           | Ccl2,CD40,CD69,CXCL10,DAXX,FAS,FCGR1A,IFI16,IFI47,IFIT2,IFIT3,IFNB1,IL18,IL27,IL6,IRF7,ISG20,LCN2,Mx1/Mx2,OASL,Oasl2,PARP12      |
| MYD88              | other                      | Inhibited                  | -5.028             | 1.44E-27           | Apol9a/Apol9b,AXL,Ccl9,CD40,CXCL10,CXCL3,DUSP6,IFI16,IFIT2,IFIT3,IFNB1,IL18,IL1B,IL27,IL6,IRF7,Mx1/Mx2,NOS2,OASL,Oasl2,PARP      |
| PTGER4             | g-protein coupled receptor | Activated                  | 4.61               | 2.00E-27           | BCL3,Ccl2,CD40,CD44,CSF2,CSF3,CXCL10,CXCL3,DAXX,EGR1,ETS2,FPR2,HDC,IFIT2,IFNB1,IL18,IL1B,IL1RN,IL27,IL6,IRF7,IRF8,MMP9           |
| IFNG               | cytokine                   | Inhibited                  | -5.66              | 1.46E-26           | Ccl2,CCL2,Ccl7,CD40,CD69,CXCL10,DAXX,EDN1,GBP2,GBP4,HAVCR2,HERPUD1,IFI16,IFI47,IFIT2,IL13RA2,IL18,IL1B,IL27,IL6,IRF7,ISG20,      |
|                    |                            |                            |                    |                    | BCL3,Ccl2,CCL2,Ccl7,CD40,CD44,CSF2,CSF3,CXCL10,CXCL3,DDIT3,EDN1,FAS,GBP2,GBP3,GBP4,IFI16,IFI47,IFIT2,IFNB1,IL18,IL1B,IL27        |



**Figura 25: Predicciones realizadas sobre posibles moléculas reguladoras del efecto observado en DMPO+LPS vs LPS:** Se grafica la red de interacción existente entre las moléculas predichas de ser reguladoras (azul) y los DEGs en la comparación DMPO+LPS vs LPS. Los mismos se encuentran en color verde debido a que su expresión es menor en la condición DMPO+LPS respecto a la condición estimulada con LPS. La tabla 6 enlista los DEGs responsables de la predicción junto a su cambio de expresión (Expr Fold Change) y su rol respecto de los reguladores predichos (Activado o inhibido).



**Figura 26: Red de interacción enriquecida en la muestra DMPO+LPS “*Infectious Diseases, Gastrointestinal Diseases, Inflammatory Diseases*”.** Red de interacción funcional enriquecida en la muestra DMPO+LPS respecto a la muestra estimulada con LPS. En verde

se pueden observar aquellos genes cuya expresión es menor en DMPO+LPS respecto a la condición con LPS mientras que en rojo se observan aquellos genes cuya expresión es mayor en DMPO+LPS respecto al LPS. Las líneas sólidas indican relaciones directas entre las proteínas mientras que las líneas punteadas relaciones indirectas. Leyenda completa en la Figura suplementaria 1 del Anexo I

### **Conclusiones del análisis funcional de los efectos de DMPO sobre el transcriptoma de macrófagos estimulados con LPS**

Al tomar en cuenta los datos expuestos previamente resultantes del análisis funcional de los genes comprendidos en la lista de DEGs de la comparación DMPO+LPS vs LPS se puede concluir que DMPO interfiere el señalamiento por LPS en sus distintas vías de señalamiento (MyD88-dependiente y TRIF-dependiente).

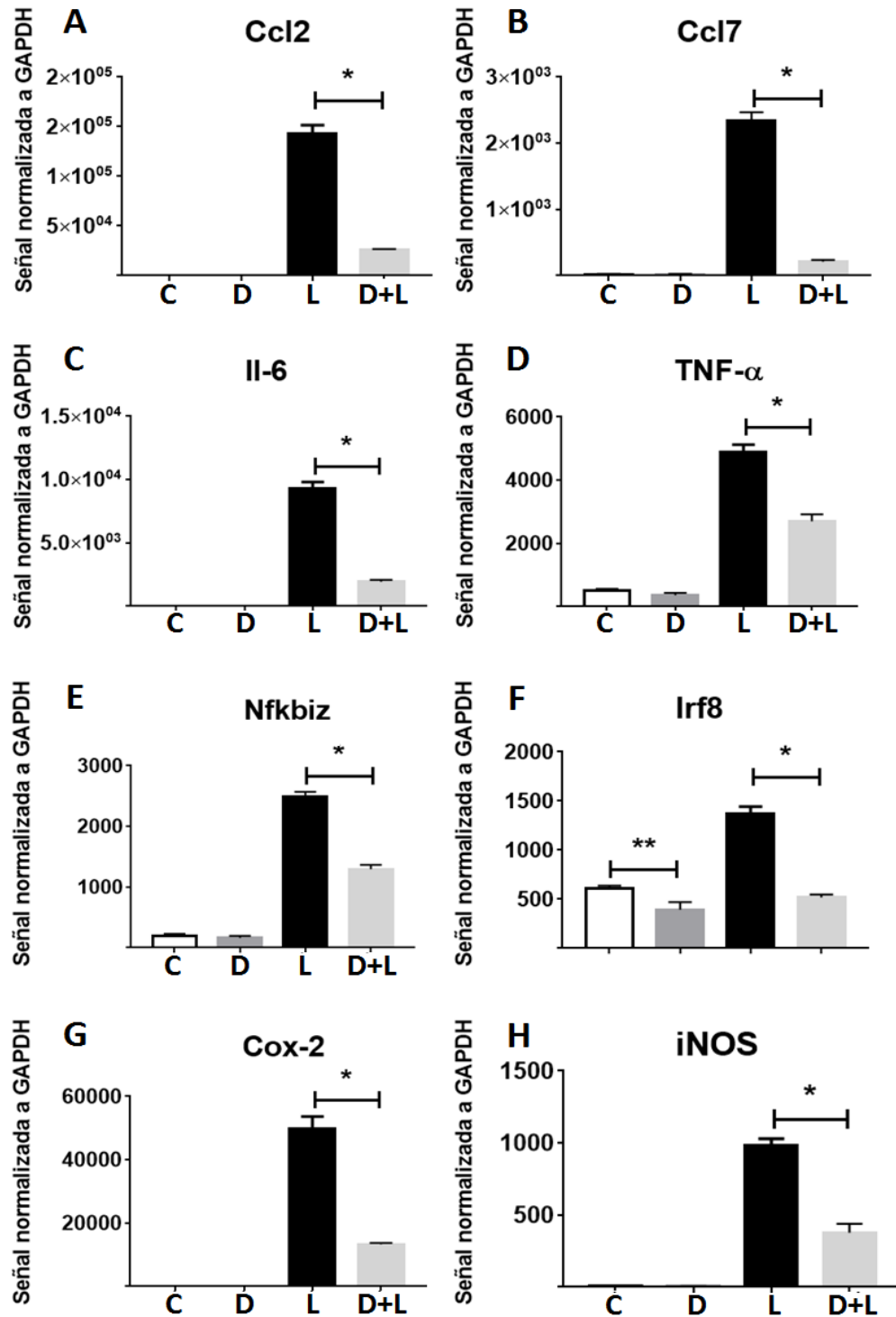
## **2.2: Corroboración de los datos obtenidos en el análisis bioinformático de los datos de microarray**

Con el propósito de corroborar las observaciones generadas en el análisis transcriptómico se realizaron experimentos de ELISA y Nanostring sobre células RAW 264,7 estimuladas con 1 ng/ml LPS en presencia o ausencia de 50 mM DMPO por 6 horas en búsqueda de los genes señalados por el análisis funcional.

En primer lugar, se analizó el perfil de citocinas utilizando nCounter Digital Analyzer<sup>TM</sup>. En la **Figura 27** se pueden observar los comportamientos de los ARNm de diferentes citocinas pro-inflamatorias resaltadas en el análisis funcional del software IPA por la magnitud de su cambio en la expresión y por su importancia en el proceso de regulación de la respuesta inflamatoria por DMPO. También fueron graficadas las enzimas iNOS y cox-2 como marcadoras moleculares de la respuesta inflamatoria en respuesta a LPS.

Los resultados obtenidos son consistentes con aquellos obtenidos por la tecnología de microarreglos donde citocinas proinflamatorias como CCL2, CCL7, Il-6 y TNF- $\alpha$  (**Fig. 27 A; B; C y D**) son secretadas en presencia de LPS y este efecto es inhibido por DMPO. Por

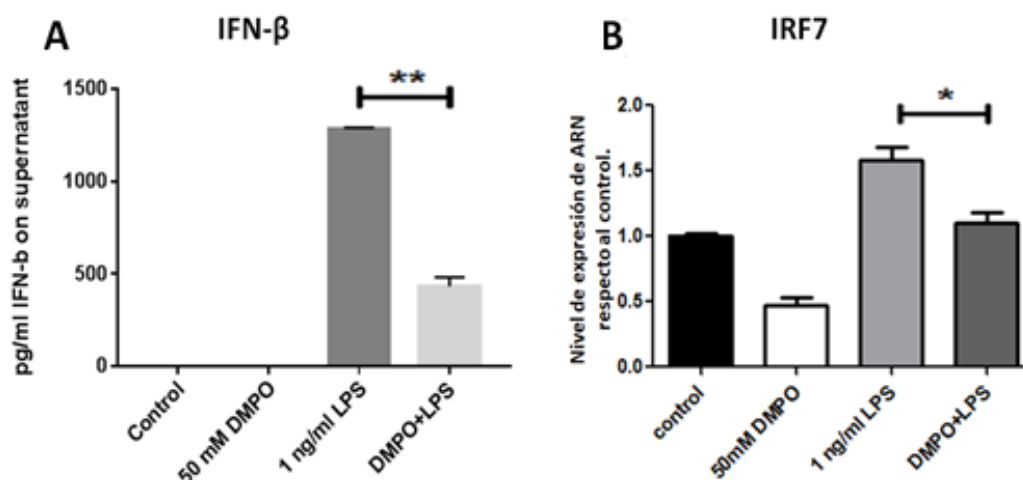
otro lado, se observan en el panel E y F proteínas relacionadas al señalamiento de TLR-4 MyD88-dependiente (NfkBiz) y TRIF-dependiente (IRF8) las cuales son estimuladas por LPS y este efecto es bloqueado por DMPO. Cabe resaltar que en el caso de IRF8 (**Fig. 27F**), DMPO por sí solo reduce los niveles basales por debajo de la condición sin estímulo. Por último se observa el mismo comportamiento para las enzimas iNOS y cox-2.



**Figura 27:** Niveles de expresión de citocinas proinflamatorias en macrófagos estimulados con LPS en presencia o ausencia de DMPO. Células RAW 264,7 fueron estimuladas con 1 ng/ml LPS en presencia o ausencia de 50 mM DMPO. Luego de 6 horas

de incubación, el ARN fue extraído e hibridado en una plataforma Nanostrings Mouse ImmunologyCodeset (NS\_Immunology\_C2269-547 transcritos). Las expresión génica de las muestras hibridadas con Nanostring fueron cuantificadas utilizando nCounter Digital Analyzer<sup>TM</sup> y normalizada utilizando los controles positivos y negativos provistos por el fabricante con nSolver (v3.0)<sup>TM</sup> software. Se observan los niveles de CCL2, CCL7, IL-6 y TNF- $\alpha$ . Se utilizó como gen control GAPDH. Los valores observados corresponden al promedio de 3 experimentos independientes. P-value < 0,01 = \*.

Luego se realizó la determinación de los niveles de ARN del factor de transcripción IRF7 por la técnica de RT-PCR y su actividad a través de la técnica de ELISA para IFN- $\beta$  (interferón-beta se encuentra bajo el control transcripcional de IRFs). Los resultados se presentes en la **Figura 28** indican que DMPO reduce los niveles de expresión del factor de transcripción IRF7 respecto a la condición LPS así como también su actividad medida por la secreción de la citocina IFN- $\beta$ , confirmando su efecto anti-inflamatorio a través de la interferencia del señalamiento por TLR-4 TRIF-dependiente.

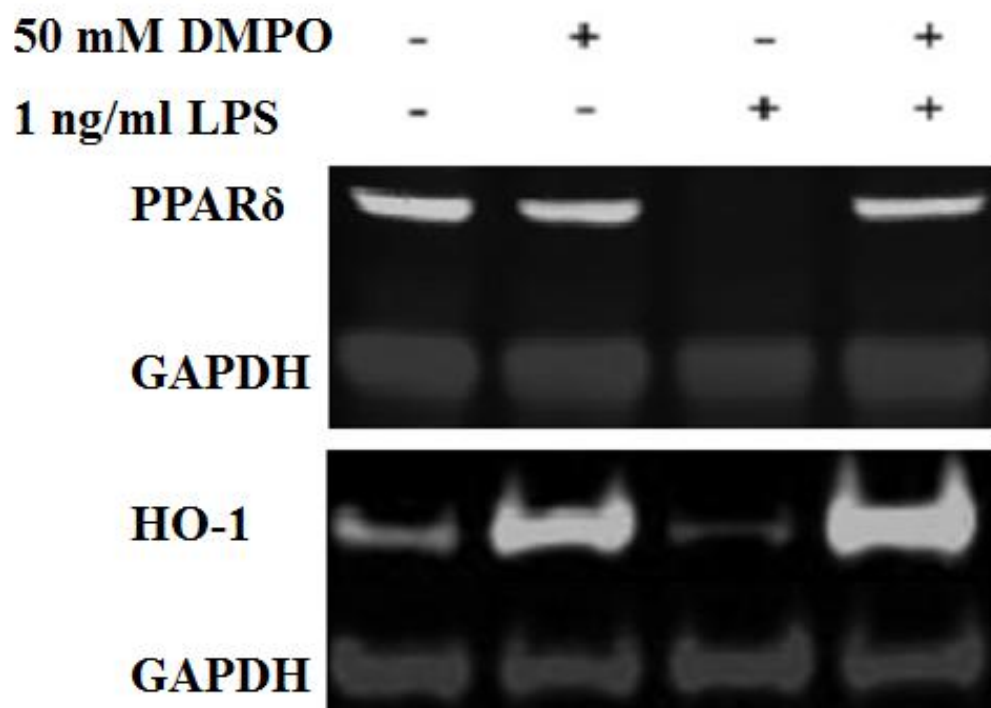


**Figura 28: Niveles de expresión de IRF7 y su actividad a través de la determinación de IFN- $\beta$ .** Células RAW 264.7 incubadas por 24 horas con 1 ng/ml LPS en presencia o ausencia de 50 mM DMPO. Luego del estímulo: **A)** el sobrenadante fue utilizado para determinación de la concentración de IFN-beta por ELISA; **B)** Se extrajo ARN y se evaluó por RT-PCR los



niveles de expresión de IRF7. Se observan los promedios de 3 experimentos independientes. P-value < 0,01 = \*\*; P-value < 0,05 = \*.

A continuación, se procedió a determinar los niveles proteicos del factor de transcripción PPAR $\delta$  y de la enzima anti-oxidante hemoxigenasa-1 (HO-1 = proteína bajo el control transcripcional de PPAR $\delta$ ) utilizando la técnica de Western-blot (**Fig. 29**).



**Figura 29: Efecto de DMPO sobre los niveles de expresión de PPAR $\delta$  y HO-1:** Células RAW 264.7 fueron incubadas por 24 horas con 1 ng/ml de LPS en presencia o ausencia de 50 mM DMPO. Luego del estímulo las células fueron lavadas con PBS frío y lisadas y sus proteínas fueron utilizadas para la determinación de utilizando la técnica de western-blot con la proteína GAPDH como control de carga. Se observa la imagen más representativa de un total de 3 experimentos independientes.



Se puede observar en la **Figura 29** como DMPO restablece los niveles proteicos del factor de transcripción anti-inflamatorio PPAR $\delta$  (disminuidos en la muestra con LPS) así como también aumenta los niveles de HO-1 por sí solo y en presencia de LPS. Si bien ambas proteínas no se encuentran en el análisis bioinformático, se decidió determinar sus niveles de expresión debido a que pertenecen a una serie de marcadores moleculares de la activación anti-inflamatoria de macrófagos [32].

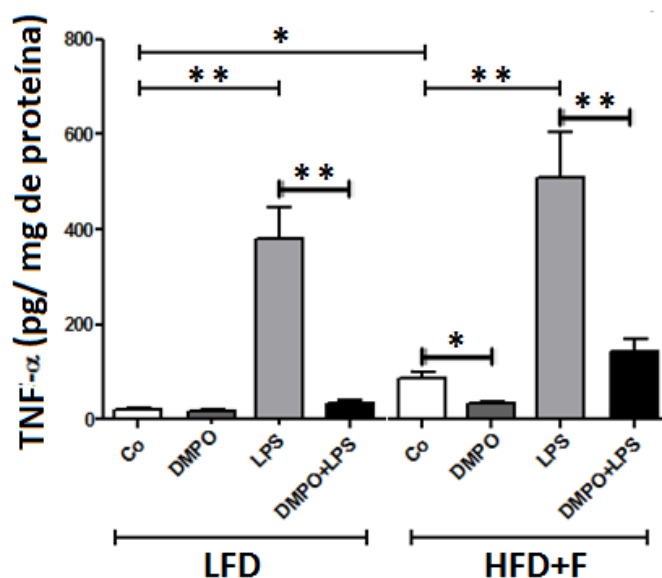
### **Conclusiones del estudio de los efectos a largo plazo de DMPO sobre el perfil de activación de macrófagos murinos.**

El estudio de los efectos a largo plazo de DMPO sobre macrófagos estimulados con LPS indica un sorprendente efecto de la incubación de DMPO sobre el transcriptoma de macrófagos. El análisis funcional indica que la inhibición de la transcripción de genes por parte de DMPO se encuentra relacionada a funciones del sistema inmune con receptores TLR 4; TLR3 y TLR9, el factor de transcripción IRF7 y las citocinas CCL2, CCL10, IL-1B y TNF como principales contribuyentes. Los experimentos de Nanostring, PCR y ELISA confirman los efectos observados por el estudio bioinformático donde citocinas, factores de transcripción y enzimas inflamatorias son estimuladas por LPS y este efecto es inhibido por DMPO. Por último, la determinación por western-blot indicó que DMPO restablece los niveles proteicos del factor de transcripción anti-inflamatorio PPAR $\delta$  (disminuidos en la muestra con LPS) así como también aumenta los niveles de HO-1 por sí solo y en presencia de LPS.

### 3. Estudio de los efectos anti-inflamatorios in-vivo de DMPO en un modelo de instilación intratraqueal a ratones con síndrome metabólico

Con el propósito de determinar los efectos anti-inflamatorios de DMPO se determinó su efecto sobre el perfil inflamatorio en el suero y el tejido adiposo epididimal obtenidos de un modelo *in vivo* de ratones con síndrome metabólico inducido por dieta[86]. Durante la última semana se realizaron instilaciones diarias intratraqueales de 2,5 milimoles de DMPO/ratón diluido en PBS. El día anterior al sacrificio se instiló LPS a un grupo de ratones junto con PBS o DMPO.

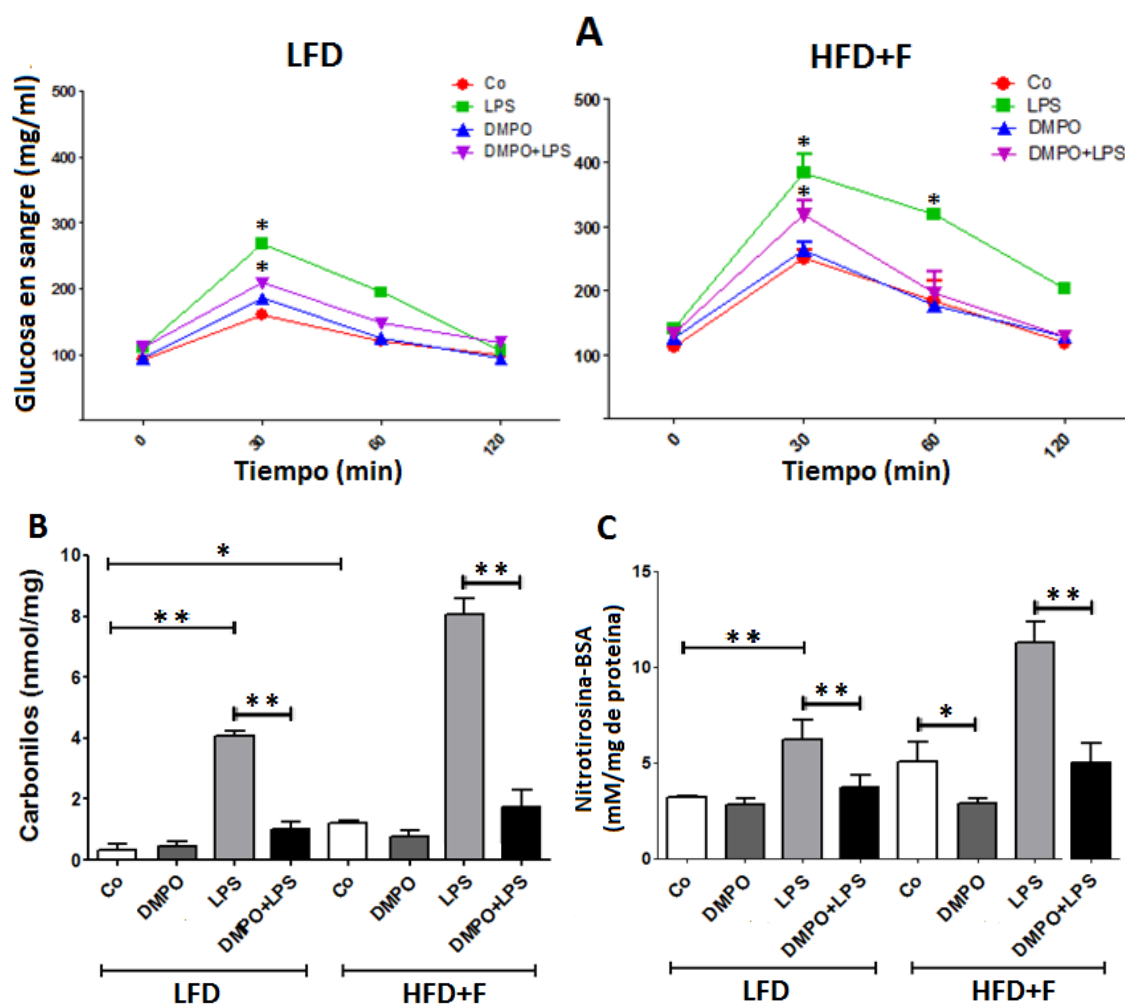
El día del sacrificio se realizó el test de tolerancia a la glucosa y se extrajo grasa epididimal (debido a que es el compartimento de grasas visceral más fácilmente aislable) para la determinación de parámetros de oxidación generalizada (carbonilos y nitrotirosina) y suero para la determinación de inflamación sistémica a partir de la concentración de la citocina inflamatoria TNF- $\alpha$ . En la **Figura 29** se muestra la concentración de TNF- $\alpha$  en suero de los ratones como marcador de inflamación sistémica. Por otro lado en la **Figura 30** se observa la curva de tolerancia a la glucosa (**Fig. 30A**), concentración de oxidación de proteínas en grasa (**Fig. 30B**) y nivel de proteínas de grasa nitradas (**Fig. 30C**).



**Figura 29:** Efecto de la instilación intratraqueal de DMPO y/o LPS sobre la concentración de TNF- $\alpha$  en suero ratones Control (LFD) y Síndrome Metabólico

(HDF). Los tratamientos fueron realizados durante la última semana de dieta (sem.15) con PBS (control), DMPO (instilación diaria durante los últimos 7 días) o LPS (única instilación el día anterior al sacrificio). La concentración de la citocina fue medida por la técnica de ELISA a partir del suero de ratones en el día de sacrificio. Los datos son expresados como valores medios  $\pm$  SEM (n=4). \*p<0,05; \*\*p<0,01.

Los resultados presentes en la figura 29 indican que DMPO disminuye a niveles basales la concentración de TNF- $\alpha$  en ratones control y con síndrome metabólico con respecto a los ratones instilados con LPS. Por otro lado, DMPO restablece la concentración de la citocina proinflamatoria a niveles de ratones control en ratones con síndrome metabólico.



**Figura 30: Efecto de la instilación de DMPO sobre parámetros de inflamación de grasa epididimal de ratones Control (LFD) y ratones con síndrome metabólico (HFD+F). A):** Curva de tolerancia a la glucosa realizada el día del sacrificio luego de la instilación por 7 días de DMPO y/o instilación única de LPS el día del sacrificio; **B):** Determinación del estado de oxidación de proteínas de grasa epididimal por la técnica de carbonilos (ELISA); **C):** determinación de proteínas de grasa epididimal nitradas utilizando la técnica de ELISA con anticuerpos anti-nitrotrosina. Los datos son expresados como valores medios  $\pm$  SEM (n=4). \*p<0,05; \*\*p<0,01.

Se puede observar en la **Figura 30A** un claro efecto sensibilizante a la insulina por parte de DMPO en aquellos ratones instilados con LPS en ambos grupos experimentales siendo más evidente en ratones con SM. Sin embargo, DMPO no fue capaz de reducir a niveles de ratones control la concentración de glucosa en sangre de los ratones con SM a ninguno de los tiempos evaluados.

Por último, se puede observar en las **Figuras 30 B y C** como disminuye el nivel de proteínas oxidadas (carbonilos) y nitradas en aquellos ratones a los cuales se les instiló DMPO en conjunto con LPS con respecto a aquellos ratones que solamente fueron instilados con LPS. Juntos, estos resultados indican que la instilación por 7 días de DMPO posee efectos anti-inflamatorios/ anti-oxidantes en la grasa epididimal de ratones control y con SM instilados con LPS siendo más evidente su efecto en ratones con SM.

#### **Conclusiones del estudio de los efectos anti-inflamatorios in-vivo de DMPO en un modelo de instilación intratraqueal a ratones con síndrome metabólico**

El estudio de los efectos in-vivo de DMPO sobre ratones instilados con LPS indica que DMPO es capaz de revertir los efectos inflamatorios del LPS sobre la tolerancia a la glucosa y los marcadores de estrés oxidativo en grasa. Sin embargo, DMPO parece no ser capaz de restablecer a valores normales los niveles basales de oxidación e inflamación en el tejido adiposo de ratones con síndrome metabólico.



---

# DISCUSIÓN

---



## DISCUSIÓN

La obesidad es una enfermedad inflamatoria crónica. En esta enfermedad resulta crítica la inflamación del tejido adiposo, en el cual ocurre la activación inflamatoria de los macrófagos debido a factores del microambiente del TA obeso entre los que se encuentran hipoxia, estrés metabólico, translocación de endotoxina bacteriana a partir del tubo intestinal y producción de mediadores inflamatorios solubles [47-52]. En estudios previos hemos encontrado que la activación inflamatoria de los macrófagos de la línea celular RAW264.7 puede ser inhibida por la nitrona DMPO, pero estos estudios no abordan los mecanismos por los cuales DMPO (y posiblemente otros espin traps) ejerce sus efectos [66, 70]. En el presente estudio determinamos posibles mecanismos mediante los cuales la nitrona DMPO inhibe la activación inflamatoria de los macrófagos por LPS y demostramos que este compuesto puede proteger la sensibilidad a la insulina en ratones tratados con LPS. Para lograr esto hemos realizado trabajo experimental *in vitro* e *in vivo* junto a herramientas bioinformáticas. La presente tesis tiene la particularidad de ser la primera en la Universidad Nacional de San Luis en implementar herramientas bioinformáticas para el análisis de datos transcriptómicos. En este caso, la bioinformática aplicada fue utilizada para determinar los cambios en el transcriptoma de macrófagos expuestos a DMPO a nivel global. Por lo que los hallazgos no apuntan a un gen en particular sino, a funciones celulares y vías de señalamiento.

Originalmente los espin trap de tipo nitrona como PBN y DMPO fueron desarrollados con el propósito de atrapar y estabilizar radicales libres, permitiendo su estudio por ESR o inmunospin trapping [67]. Sin embargo, el descubrimiento de que las nitronas poseen efectos anti-oxidantes y citoprotectores generó interés en su aplicación farmacológica como drogas anti-inflamatorias [58]. En este sentido compuestos derivados de PBN han sido probados en diferentes modelos alcanzando la fase III de pruebas clínicas[98]. En contraste, DMPO (o análogos estructurales) no han sido probados como fármacos anti-inflamatorios, lo que puede ser debido a que la síntesis de DMPO es muy cara comparada con PBN y porque en la actualidad los efectos in-vivo de DMPO no han sido descriptos.

PBN y DMPO han demostrado propiedades anti-inflamatorias en distintos modelos experimentales. Ambos han sido capaces de interferir en el señalamiento gatillado por LPS relacionado a MAPK, Akt, iNOS, COX-2 y citocinas proinflamatorias, sugiriendo que estos

efectos pueden estar relacionados al motivo de nitrona [70, 71]. Dichos efectos no pueden estar relacionados al secuestro del anión superóxido debido a que ambas nitronas poseen constantes de reacción muy bajas para con él [99]. Por otro lado, los efectos observados tampoco pueden ser explicados por la capacidad de DMPO de detener la reacción en cadena de radicalización de macromoléculas como las proteínas o ADN debido que a *in vivo*, DMPO compite con compuestos anti-oxidantes como glutatión y ascorbato, quienes poseen mayores constantes de reacción, por lo que se requerirían mayores concentraciones de DMPO para superar la competencia [61]. Por último, los efectos anti-inflamatorios no pueden ser explicados por DMPO interfiriendo la señalización dependiente de redox, debido a que esta funciona principalmente con procesos de óxido-reducción de grupos tioles en los cuales no se producen radicales libres, por lo que DMPO no puede unirse a ellos [79]. Actualmente las causas exactas de los efectos producidos por los espin traps permanecen desconocidas.

En base a lo descrito previamente, la presente tesis abordó el estudio de los mecanismos por los cuales DMPO ejerce su efecto anti-inflamatorio sobre la biología de macrófagos utilizando una aproximación más amplia a través del uso de nuevas tecnologías y 3 modelos experimentales distintos.

En primer lugar, se analizaron los efectos de la incubación de 50 mM DMPO por 6 horas sobre el transcriptoma de células RAW 264.7 en reposo utilizando la tecnología de microarreglos. El espin trap fue capaz de afectar los niveles de expresión de 80 genes (respecto al control) de los cuales el 71% fueron inhibidos. Luego se le asignó significado biológico a la variación observada a través del análisis funcional utilizando la base de datos DAVID y el software IPA. Resulta particularmente interesante que el análisis funcional realizado tuvo como resultado que los genes afectados por DMPO se encuentran relacionados a la regulación negativa del sistema inmune y procesos inflamatorios, con IRF7 como principal molécula responsable del efecto. Estudios realizados en ratones demuestran que la ausencia de IRF7 previene la inflamación en ratones con obesidad inducida por dieta [100], por lo que la disminución del mismo y de su actividad (medida a través de la determinación de IFN- $\beta$  por ELISA) por parte de DMPO indica un mecanismo de actividad anti-inflamatoria. Por otro lado, el espin trap además incrementó los niveles de expresión de genes relacionados a la síntesis de glutatión, lo que sumado a lo descrito previamente indica un

efecto transcriptómico anti-oxidante/ anti-inflamatorio. Estos efectos no pueden ser explicados por la capacidad de DMPO interactuando con radicales protéicos necesarios para el señalamiento redox debido que los efectos son casi exclusivamente relacionados al sistema inmune. Si DMPO interfiriera en esta clase de señalamiento, los efectos observados estarían relacionados a un gran número de procesos celulares debido a la promiscuidad de los radicales libres.

En segundo lugar, se analizaron los efectos del espin trap sobre el transcriptoma de macrófagos estimulados con LPS. En este caso, la expresión varió significativamente en 215 genes de los cuales el 75% fue inhibido comparado con células estimuladas. El análisis funcional realizado indicó que los cambios transcriptómicos estaban relacionados al señalamiento por múltiples TLRs y factores de transcripción de respuesta el interferón como IRF 7 y 8, dando lugar un fenotipo consistente con DMPO interfiriendo la señalización gatillada por LPS a través del receptor TLR-4 en sus distintas formas: Myd88 dependiente y TRIF dependiente [44, 101]. Luego, los cambios en la expresión de aquellos genes señalados por el software IPA como principales contribuyentes al fenotipo descripto, ya sea por su rol central en los procesos alterados o bien por su magnitud en la variación, fueron confirmados utilizando la tecnología nCounter junto a las técnicas de ELISA y RT-PCR. Entre los genes confirmados se encuentran aquellos relacionados a la vía de señalización TRIF-dependiente del TLR-4 como IFN- $\beta$  e IRF7 y genes relacionados a la vía Myd-88 dependiente como CCL2, CCL7 y NF $\kappa$ B. Todos ellos presentaron el mismo comportamiento al ser estimulados por LPS e inhibidos por el agregado de DMPO.

El hecho de que los cambios transcriptómicos generados por DMPO estén relacionados a múltiples TLR, indica la posibilidad de que el espin trap interactúe con algunos de ellos. Los receptores TLR poseen una estructura de 3 dominios: extracelular, intramembrana e intercelular [43]. Tanto el dominio extracelular responsable de la interacción con el ligando como el dominio intramembrana varían radicalmente entre los TLR, pero el dominio intracelular TIR se conserva a lo largo de los diferentes TLR y distintas especies [23]. En base a esto se procedió al estudio in-silico de la interacción del espin trap con el dominio TIR del receptor TLR-2 debido a su similitud con TLR-4 (quien desafortunadamente no se encuentra cristalizado al día de la fecha) utilizando simulaciones



de docking y dinámica molecular. Los resultados del análisis in-silico fueron sorprendentes debido a que indican que DMPO se uniría selectivamente a la región BB-loop del dominio TIR, interaccionando principalmente con Lys683. Estudios han demostrado que la estructura tridimensional de la región BB-loop es necesaria para la transducción de la señal [44]. DMPO podría interferir el señalamiento por TLRs al interactuar dinámicamente con la región BB-loop de los dominios TIR, modificando su estereoquímica y densidad electrónica. Se propone experimentos de co-inmunoprecipitación de MyD-88/TLR-2 en presencia de DMPO para corroborar la disrupción de la interacción entre las 2 proteínas involucradas en el señalamiento. Estos experimentos se realizarán en el Centre de Recherche des Cordeliers de la Universidad Pierre et Marie Curie durante el mes de enero del 2018.

Por último, se realizaron experimentos para determinar si los efectos anti-inflamatorios del DMPO son extrapolables a un modelo *in vivo* de enfermedades inflamatorias como es el de ratones con síndrome metabólico instilados con LPS. En estos experimentos el espin trap fue administrado 7 días antes del sacrificio tanto a grupos control como a ratones con síndrome metabólico. Los resultados demostraron que DMPO restablece los niveles de TNF- $\alpha$  en el suero de ratones con síndrome metabólico a niveles de ratones control pero no restablece la sensibilidad a la insulina medida indirectamente a través de la concentración de glucosa en sangre. Por otro lado, DMPO disminuye marcadores de generales de oxidación de proteínas en tejido adiposo al ser administrado en ratones control y con síndrome metabólico instilados con LPS, corroborando que los efectos anti-inflamatorios/anti-oxidantes del espin trap se extrapolan a el modelo *in vivo*. Tomando en cuenta los resultados obtenidos en el modelo animal, se concluye que DMPO tiene efectos inhibidores de la inflamación aguda generada por LPS pero no sería capaz de disminuir los niveles basales de inflamación crónica de bajo grado constituyentes del síndrome metabólico.

La información preliminar sobre los efectos anti-inflamatorios de DMPO es descriptiva de una condición particular pero no aborda los mecanismos por los cuales DMPO (y posiblemente otros espin traps) ejerce sus efectos. En este estudio se demostraron causas de las propiedades anti-inflamatorias de DMPO, proyectando a futuro la utilización de derivados de espin-traps como una plataforma estructural para el diseño de nuevos fármacos anti-inflamatorios basados en su mecanismo de acción.



---

# CONCLUSIONES

---



## **CONCLUSIONES DEL ESTUDIO DE LOS MECANISMOS ANTI-INFLAMATORIOS DE LA NITRONA 5,5-DIMETIL-1-PIRROLINA N-OXIDO:**

- 1) La incubación por 6 horas con 50 mM DMPO genera en células RAW 264.7 cambios en el transcriptoma relacionados sorprendentemente a la regulación negativa de los procesos del sistema inmune
- 2) LPS es capaz de generar grandes cambios en el transcriptoma de macrófagos relacionados a diferentes procesos inflamatorios, dichos efectos se ven contrarrestados por la administración de DMPO
- 3) DMPO interfiere en distintas vías de señalamiento por LPS (MyD88-dependiente y TRIF-dependiente). Este fenómeno podría ser causado por la unión de DMPO al dominio TIR en la región BB-loop del receptor TLR
- 4) Los efectos de DMPO se encuentran relacionados a los receptores TLR 4; TLR3 y TLR9 y al factor de transcripción IRF7 con CCL2, CCL10, Il-1B y TNF como principales contribuyentes
- 5) DMPO restablece a niveles basales los niveles de expresión de la proteína marcadora del perfil anti-inflamatorio de macrófagos PPAR $\delta$  y aumenta los niveles de HO-1.
- 6) Los efectos anti-inflamatorios de DMPO se extrapolan al modelo in-vivo de ratones con síndrome metabólico instilados con LPS
- 7) DMPO no es capaz de restablecer a niveles basales la concentración de glucosa en sangre en ratones con síndrome metabólico respecto a ratones sanos.

## Anexo I: Figuras suplementarias

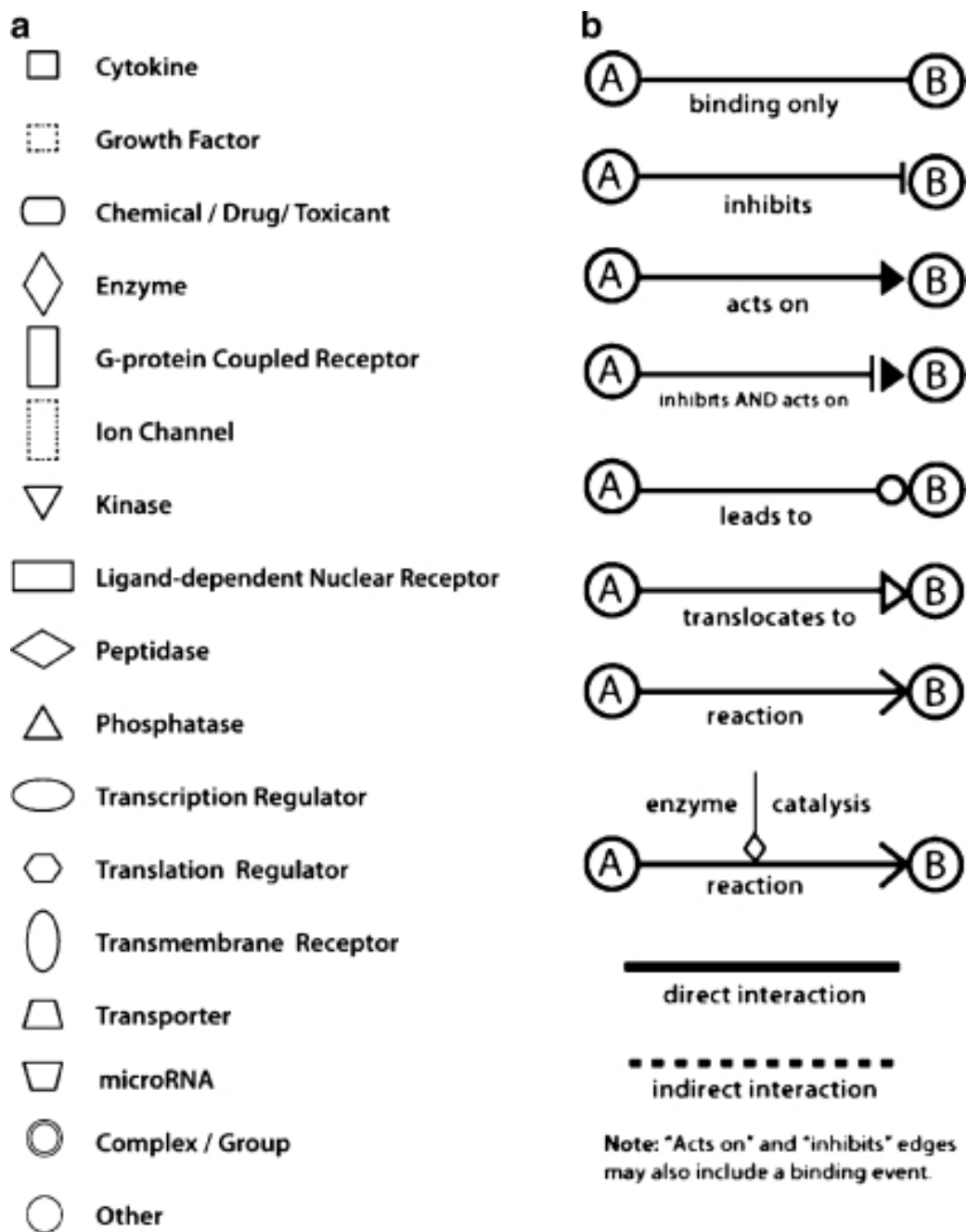


Figura suplementaria 1: Leyenda completa de las figuras obtenidas del software IPA



---

# BIBLIOGRAFÍA

---



## BIBLIOGRAFÍA

- [1] WHO, Obesity and overweight, WHO Global Strategies on Diet, Physical Activity and Health (2003).
- [2] M.a.H.B. Dang M. Nguyen, The epidemiology of obesity, 39(1) (2010).
- [3] K.N. Frayn, Obesity and metabolic disease: is adipose tissue the culprit?, *Proc Nutr Soc* 64(1) (2005) 7-13.
- [4] A. McTiernan, Obesity and cancer: the risks, science, and potential management strategies, *Oncology* (Williston Park, N.Y 19(7) (2005) 871-81; discussion 881-2, 885-6.
- [5] F.B.H. Adela Hruby, The epidemiology of obesity: A Big Picture, (2014).
- [6] Y.W. Kelly T, Chen C-S, Reynolds K, He J., Global burden of obesity in 2005 and projection to 2030, (2008).
- [7] A. Ordematt, The western-style diet: a major risk factor for impaired kidney function and chronic kidney disease, (2011).
- [8] A.K. Kant, Dietary patterns and health outcomes, *Journal of the American Dietetic Association* 104(4) (2004) 615-35.
- [9] J.F. Carroll, A.L. Chiapa, M. Rodriguez, D.R. Phelps, K.M. Cardarelli, J.K. Vishwanatha, S. Bae, R. Cardarelli, Visceral fat, waist circumference, and BMI: impact of race/ethnicity, *Obesity* (Silver Spring) 16(3) (2008) 600-7.
- [10] J. Deiluiis, Z. Shah, N. Shah, B. Needleman, D. Mikami, V. Narula, K. Perry, J. Hazey, T. Kampfrath, M. Kollengode, Q. Sun, A.R. Satoskar, C. Lumeng, S. Moffatt-Bruce, S. Rajagopalan, Visceral adipose inflammation in obesity is associated with critical alterations in tregulatory cell numbers, *PLoS One* 6(1) (2011) e16376.
- [11] M.K. Ohman, A.P. Wright, K.J. Wickenheiser, W. Luo, D.T. Eitzman, Visceral adipose tissue and atherosclerosis, *Curr Vasc Pharmacol* 7(2) (2009) 169-79.
- [12] A. Onat, M. Ugur, G. Can, H. Yuksel, G. Hergenc, Visceral adipose tissue and body fat mass: predictive values for and role of gender in cardiometabolic risk among Turks, *Nutrition* 26(4) (2010) 382-9.
- [13] A. Verrijken, S. Francque, I. Mertens, M. Talloen, F. Peiffer, L. Van Gaal, Visceral adipose tissue and inflammation correlate with elevated liver tests in a cohort of overweight and obese patients, *Int J Obes (Lond)* 34(5) (2010) 899-907.
- [14] R.H. Eckel, S.M. Grundy, P.Z. Zimmet, The metabolic syndrome, *Lancet* 365(9468) (2005) 1415-28.
- [15] P. Zimmet, K.G. Alberti, J. Shaw, Global and societal implications of the diabetes epidemic, *Nature* 414(6865) (2001) 782-7.
- [16] K.G. Alberti, R.H. Eckel, S.M. Grundy, P.Z. Zimmet, J.I. Cleeman, K.A. Donato, J.C. Fruchart, W.P. James, C.M. Loria, S.C. Smith, Jr., Harmonizing the metabolic syndrome: a joint interim statement of the International Diabetes Federation Task Force on Epidemiology and Prevention; National Heart, Lung, and Blood Institute; American Heart Association; World Heart Federation; International Atherosclerosis Society; and International Association for the Study of Obesity, *Circulation* 120(16) (2009) 1640-5.
- [17] M. Mar Bibiloni, E. Martinez, R. Llull, E. Maffiotte, M. Riesco, I. Llompart, A. Pons, J.A. Tur, Metabolic syndrome in adolescents in the Balearic Islands, a Mediterranean region, *Nutr Metab Cardiovasc Dis* 21(6) (2011) 446-54.
- [18] K.E. Bornfeldt, I. Tabas, Insulin resistance, hyperglycemia, and atherosclerosis, *Cell metabolism* 14(5) (2011) 575-85.
- [19] R.J.G.A.B.D.A.H.N.C.B.E.A. Robinson, *Química Biológica*, (1988).

- [20] A. Cuevas, V. Alvarez, F. Carrasco, Epidemic of metabolic syndrome in Latin America, *Current opinion in endocrinology, diabetes, and obesity* 18(2) (2011) 134-8.
- [21] M. Stumvoll, B.J. Goldstein, T.W. van Haeften, Type 2 diabetes: principles of pathogenesis and therapy, *Lancet* 365(9467) (2005) 1333-46.
- [22] C. de Luca, J.M. Olefsky, Inflammation and insulin resistance, *FEBS letters* 582(1) (2008) 97-105.
- [23] S. Cinti, The adipose organ, Prostaglandins, leukotrienes, and essential fatty acids 73(1) (2005) 9-15.
- [24] D. Nam, B. Guo, S. Chatterjee, M.H. Chen, D. Nelson, V.K. Yechoor, K. Ma, The adipocyte clock controls brown adipogenesis through the TGF-beta and BMP signaling pathways, *Journal of cell science* 128(9) (2015) 1835-47.
- [25] N.S. Kalupahana, (n-3) Fatty Acids Alleviate Adipose Tissue, (2011).
- [26] M.T. Foster, M.J. Pagliassotti, Metabolic alterations following visceral fat removal and expansion: Beyond anatomic location, *Adipocyte* 1(4) (2012) 192-199.
- [27] C. Chavey, B. Mari, M.N. Monthouel, S. Bonnafe, P. Anglard, E. Van Obberghen, S. Tartare-Deckert, Matrix metalloproteinases are differentially expressed in adipose tissue during obesity and modulate adipocyte differentiation, *The Journal of biological chemistry* 278(14) (2003) 11888-96.
- [28] K. Kos, J.P. Wilding, SPARC: a key player in the pathologies associated with obesity and diabetes, *Nature reviews. Endocrinology* 6(4) (2010) 225-35.
- [29] F. Geissmann, S. Jung, D.R. Littman, Blood monocytes consist of two principal subsets with distinct migratory properties, *Immunity* 19(1) (2003) 71-82.
- [30] F. Tacke, D. Alvarez, T.J. Kaplan, C. Jakubzick, R. Spanbroek, J. Llodra, A. Garin, J. Liu, M. Mack, N. van Rooijen, S.A. Lira, A.J. Habenicht, G.J. Randolph, Monocyte subsets differentially employ CCR2, CCR5, and CX3CR1 to accumulate within atherosclerotic plaques, *The Journal of clinical investigation* 117(1) (2007) 185-94.
- [31] J.M. Olefsky, C.K. Glass, Macrophages, inflammation, and insulin resistance, *Annual review of physiology* 72 (2010) 219-46.
- [32] L. Mukundan, J.I. Odegaard, C.R. Morel, J.E. Heredia, J.W. Mwangi, R.R. Ricardo-Gonzalez, Y.P. Goh, A.R. Eagle, S.E. Dunn, J.U. Awakuni, K.D. Nguyen, L. Steinman, S.A. Michie, A. Chawla, PPAR-delta senses and orchestrates clearance of apoptotic cells to promote tolerance, *Nature medicine* 15(11) (2009) 1266-72.
- [33] R. Scaglione, T. Di Chiara, T. Cariello, G. Licata, Visceral obesity and metabolic syndrome: two faces of the same medal?, *Intern Emerg Med* 5(2) (2010) 111-9.
- [34] S.P. Weisberg, D. McCann, M. Desai, M. Rosenbaum, R.L. Leibel, A.W. Ferrante, Jr., Obesity is associated with macrophage accumulation in adipose tissue, *The Journal of clinical investigation* 112(12) (2003) 1796-808.
- [35] H. Xu, G.T. Barnes, Q. Yang, G. Tan, D. Yang, C.J. Chou, J. Sole, A. Nichols, J.S. Ross, L.A. Tartaglia, H. Chen, Chronic inflammation in fat plays a crucial role in the development of obesity-related insulin resistance, *The Journal of clinical investigation* 112(12) (2003) 1821-30.
- [36] M.F. Gregor, G.S. Hotamisligil, Inflammatory Mechanisms in Obesity, *Annu Rev Immunol* (2010).
- [37] C.N. Lumeng, J.L. Bodzin, A.R. Saltiel, Obesity induces a phenotypic switch in adipose tissue macrophage polarization, *The Journal of clinical investigation* 117(1) (2007) 175-84.
- [38] C.N. Lumeng, Adipose tissue macrophages: a piece of the PAI of metabolic syndrome, *Science translational medicine* 2(20) (2010) 20ps7.

- [39] C.N. Lumeng, J.B. DelProposto, D.J. Westcott, A.R. Saltiel, Phenotypic switching of adipose tissue macrophages with obesity is generated by spatiotemporal differences in macrophage subtypes, *Diabetes* 57(12) (2008) 3239-46.
- [40] C.N. Lumeng, S.M. Deyoung, J.L. Bodzin, A.R. Saltiel, Increased inflammatory properties of adipose tissue macrophages recruited during diet-induced obesity, *Diabetes* 56(1) (2007) 16-23.
- [41] C.M. Filippi, Toll-Like Receptor Activation in Immunity vs. Tolerance, *Frontiers in immunology* 6 (2015) 146.
- [42] E.M. Palsson-McDermott, L.A. O'Neill, Signal transduction by the lipopolysaccharide receptor, Toll-like receptor-4, *Immunology* 113(2) (2004) 153-62.
- [43] S. Akira, K. Takeda, Toll-like receptor signalling, *Nature reviews. Immunology* 4(7) (2004) 499-511.
- [44] S. Basith, B. Manavalan, R.G. Govindaraj, S. Choi, In silico approach to inhibition of signaling pathways of Toll-like receptors 2 and 4 by ST2L, *PloS one* 6(8) (2011) e23989.
- [45] Y. Xu, X. Tao, B. Shen, T. Horng, R. Medzhitov, J.L. Manley, L. Tong, Structural basis for signal transduction by the Toll/interleukin-1 receptor domains, *Nature* 408(6808) (2000) 111-5.
- [46] P. Trayhurn, B. Wang, I.S. Wood, Hypoxia in adipose tissue: a basis for the dysregulation of tissue function in obesity?, *The British journal of nutrition* 100(2) (2008) 227-35.
- [47] G. Boden, G.I. Shulman, Free fatty acids in obesity and type 2 diabetes: defining their role in the development of insulin resistance and beta-cell dysfunction, *Eur J Clin Invest* 32 Suppl 3 (2002) 14-23.
- [48] G. Boden, M. Silviera, B. Smith, P. Cheung, C. Homko, Acute tissue injury caused by subcutaneous fat biopsies produces endoplasmic reticulum stress, *J Clin Endocrinol Metab* 95(1) (2010) 349-52.
- [49] J. Khasawneh, M.D. Schulz, A. Walch, J. Rozman, M. Hrabe de Angelis, M. Klingenspor, A. Buck, M. Schwaiger, D. Saur, R.M. Schmid, G. Kloppel, B. Sipos, F.R. Greten, M.C. Arkan, Inflammation and mitochondrial fatty acid beta-oxidation link obesity to early tumor promotion, *Proc Natl Acad Sci U S A* 106(9) (2009) 3354-9.
- [50] C. Erridge, T. Attina, C.M. Spickett, D.J. Webb, A high-fat meal induces low-grade endotoxemia: evidence of a novel mechanism of postprandial inflammation, *Am J Clin Nutr* 86(5) (2007) 1286-92.
- [51] S. Kim, N. Moustaid-Moussa, Secretory, endocrine and autocrine/paracrine function of the adipocyte, *The Journal of nutrition* 130(12) (2000) 3110S-3115S.
- [52] P. Wang, E. Mariman, J. Renes, J. Keijer, The secretory function of adipocytes in the physiology of white adipose tissue, *Journal of cellular physiology* 216(1) (2008) 3-13.
- [53] J. Ye, Z. Gao, J. Yin, Q. He, Hypoxia is a potential risk factor for chronic inflammation and adiponectin reduction in adipose tissue of ob/ob and dietary obese mice, *American journal of physiology. Endocrinology and metabolism* 293(4) (2007) E1118-28.
- [54] M. Pasarica, O.R. Sereda, L.M. Redman, D.C. Albarado, D.T. Hymel, L.E. Roan, J.C. Rood, D.H. Burk, S.R. Smith, Reduced adipose tissue oxygenation in human obesity: evidence for rarefaction, macrophage chemotaxis, and inflammation without an angiogenic response, *Diabetes* 58(3) (2009) 718-25.
- [55] G. Boden, X. Duan, C. Homko, E.J. Molina, W. Song, O. Perez, P. Cheung, S. Merali, Increase in endoplasmic reticulum stress-related proteins and genes in adipose tissue of obese, insulin-resistant individuals, *Diabetes* 57(9) (2008) 2438-44.
- [56] P. Ziccardi, F. Nappo, G. Giugliano, K. Esposito, R. Marfella, M. Cioffi, F. D'Andrea, A.M. Molinari, D. Giugliano, Reduction of inflammatory cytokine concentrations and improvement of endothelial functions in obese women after weight loss over one year, *Circulation* 105(7) (2002) 804-9.



- [57] A. Gomez-Hernandez, L. Perdomo, O. Escribano, M. Benito, [Role of white adipose tissue in vascular complications due to obesity], *Clinica e investigacion en arteriosclerosis : publicacion oficial de la Sociedad Espanola de Arteriosclerosis* 25(1) (2013) 27-35.
- [58] M. Hayyan, M.A. Hashim, I.M. AlNashef, Superoxide Ion: Generation and Chemical Implications, *Chemical reviews* 116(5) (2016) 3029-85.
- [59] E.R. Stadtman, R.L. Levine, Free radical-mediated oxidation of free amino acids and amino acid residues in proteins, *Amino acids* 25(3-4) (2003) 207-18.
- [60] C.C. Winterbourn, Reconciling the chemistry and biology of reactive oxygen species, *Nature chemical biology* 4(5) (2008) 278-86.
- [61] S.E. Gomez-Mejiba, Z. Zhai, M.C. Della-Vedova, M.D. Munoz, S. Chatterjee, R.A. Towner, K. Hensley, R.A. Floyd, R.P. Mason, D.C. Ramirez, Immuno-spin trapping from biochemistry to medicine: advances, challenges, and pitfalls. Focus on protein-centered radicals, *Biochimica et biophysica acta* 1840(2) (2014) 722-9.
- [62] E.G. Janzen, Spin trapping, *Methods in enzymology* 105 (1984) 188-98.
- [63] R.P. Mason, Imaging free radicals in organelles, cells, tissue, and in vivo with immuno-spin trapping, *Redox biology* 8 (2016) 422-9.
- [64] E.G. Janzen, M.S. West, Y. Kotake, C.M. DuBose, Biological spin trapping methodology. III. Octanol-water partition coefficients of spin-trapping compounds, *Journal of biochemical and biophysical methods* 32(3) (1996) 183-90.
- [65] K. Anzai, T. Aikawa, Y. Furukawa, Y. Matsushima, S. Urano, T. Ozawa, ESR measurement of rapid penetration of DMPO and DEPMPO spin traps through lipid bilayer membranes, *Archives of biochemistry and biophysics* 415(2) (2003) 251-6.
- [66] Z. Zhai, S.E. Gomez-Mejiba, M.S. Gimenez, L.J. Deterding, K.B. Tomer, R.P. Mason, M.T. Ashby, D.C. Ramirez, Free radical-operated proteotoxic stress in macrophages primed with lipopolysaccharide, *Free radical biology & medicine* 53(1) (2012) 172-81.
- [67] R.P. Mason, Using anti-5,5-dimethyl-1-pyrroline N-oxide (anti-DMPO) to detect protein radicals in time and space with immuno-spin trapping, *Free radical biology & medicine* 36(10) (2004) 1214-23.
- [68] J.M. Gebicki, T. Nauser, A. Domazou, D. Steinmann, P.L. Bounds, W.H. Koppenol, Reduction of protein radicals by GSH and ascorbate: potential biological significance, *Amino acids* 39(5) (2010) 1131-7.
- [69] D.C. Ramirez, S.E. Mejiba, R.P. Mason, Copper-catalyzed protein oxidation and its modulation by carbon dioxide: enhancement of protein radicals in cells, *The Journal of biological chemistry* 280(29) (2005) 27402-11.
- [70] Z. Zhai, S.E. Gomez-Mejiba, H. Zhu, F. Lupu, D.C. Ramirez, The spin trap 5,5-dimethyl-1-pyrroline N-oxide inhibits lipopolysaccharide-induced inflammatory response in RAW 264.7 cells, *Life sciences* 90(11-12) (2012) 432-9.
- [71] Y. Kotake, H. Sang, T. Miyajima, G.L. Wallis, Inhibition of NF-kappaB, iNOS mRNA, COX2 mRNA, and COX catalytic activity by phenyl-N-tert-butyl nitron (PBN), *Biochimica et biophysica acta* 1448(1) (1998) 77-84.
- [72] K.R. Lees, J.A. Zivin, T. Ashwood, A. Davalos, S.M. Davis, H.C. Diener, J. Grotta, P. Lyden, A. Shuaib, H.G. Hardemark, W.W. Wasiewski, NXY-059 for acute ischemic stroke, *The New England journal of medicine* 354(6) (2006) 588-600.
- [73] R.A. Floyd, R.D. Kopke, C.H. Choi, S.B. Foster, S. Doblas, R.A. Towner, Nitrones as therapeutics, *Free radical biology & medicine* 45(10) (2008) 1361-74.
- [74] S.A. Hamburger, P.B. McCay, Endotoxin-induced mortality in rats is reduced by nitrones, *Circulatory shock* 29(4) (1989) 329-34.

- [75] L. Zuo, Y.R. Chen, L.A. Reyes, H.L. Lee, C.L. Chen, F.A. Villamena, J.L. Zweier, The radical trap 5,5-dimethyl-1-pyrroline N-oxide exerts dose-dependent protection against myocardial ischemia-reperfusion injury through preservation of mitochondrial electron transport, *The Journal of pharmacology and experimental therapeutics* 329(2) (2009) 515-23.
- [76] G.R. Buettner, The spin trapping of superoxide and hydroxyl free radicals with DMPO (5,5-dimethylpyrroline-N-oxide): more about iron, *Free radical research communications* 19 Suppl 1 (1993) S79-87.
- [77] D.C. Ramirez, S.E. Mejiba, R.P. Mason, Immuno-spin trapping of DNA radicals, *Nature methods* 3(2) (2006) 123-7.
- [78] M.J. Davies, C.L. Hawkins, EPR spin trapping of protein radicals, *Free radical biology & medicine* 36(9) (2004) 1072-86.
- [79] C.R. Reczek, N.S. Chandel, ROS-dependent signal transduction, *Current opinion in cell biology* 33 (2015) 8-13.
- [80] A.J. Becker, S. Uckert, D. Tsikas, H. Noack, C.G. Stief, J.C. Frolich, G. Wolf, U. Jonas, Determination of nitric oxide metabolites by means of the Griess assay and gas chromatography-mass spectrometry in the cavernous and systemic blood of healthy males and patients with erectile dysfunction during different functional conditions of the penis, *Urological research* 28(6) (2000) 364-9.
- [81] D.C. Fernandes, R.C. Goncalves, F.R. Laurindo, Measurement of Superoxide Production and NADPH Oxidase Activity by HPLC Analysis of Dihydroethidium Oxidation, *Methods Mol Biol* 1527 (2017) 233-249.
- [82] D.A. Case, T.E. Cheatham, 3rd, T. Darden, H. Gohlke, R. Luo, K.M. Merz, Jr., A. Onufriev, C. Simmerling, B. Wang, R.J. Woods, The Amber biomolecular simulation programs, *Journal of computational chemistry* 26(16) (2005) 1668-88.
- [83] R.F.W. Bader, Atoms in molecules, *Accounts of chemical research* 18 (1985) 9-15.
- [84] Y.B.Y. Hochberg, Controlling the false discovery rate: a practical and powerful approach to multiple testing, *Journal of the Royal Statistical Society. Series B (Methodological)* 57(1) (1995) 289-300.
- [85] R. Buettner, J. Scholmerich, L.C. Bollheimer, High-fat diets: modeling the metabolic disorders of human obesity in rodents, *Obesity (Silver Spring)* 15(4) (2007) 798-808.
- [86] M.C. Della Vedova, M.D. Munoz, L.D. Santillan, M.G. Plateo-Pignatari, M.J. Germano, M.E. Rinaldi Tosi, S. Garcia, N.N. Gomez, M.W. Fornes, S.E. Gomez Mejiba, D.C. Ramirez, A Mouse Model of Diet-Induced Obesity Resembling Most Features of Human Metabolic Syndrome, *Nutrition and metabolic insights* 9 (2016) 93-102.
- [87] National Research Council (U.S.). Committee for the Update of the Guide for the Care and Use of Laboratory Animals., Institute for Laboratory Animal Research (U.S.), National Academies Press (U.S.), Guide for the care and use of laboratory animals, 8th ed., National Academies Press, Washington, D.C., 2011.
- [88] C. Anderwald, M. Roden, Adipotoxicity and the insulin resistance syndrome, *Pediatric endocrinology reviews* : PER 1(3) (2004) 310-9.
- [89] S. Andrikopoulos, A.R. Blair, N. Deluca, B.C. Fam, J. Proietto, Evaluating the glucose tolerance test in mice, *American journal of physiology. Endocrinology and metabolism* 295(6) (2008) E1323-32.
- [90] M.M. Bradford, A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding, *Analytical biochemistry* 72 (1976) 248-54.
- [91] M. Wei, L. Tu, Y. Liang, J. Liu, Y. Gong, D. Xiao, Y. Zhang, [The effect of signal transduction pathway of triggering receptor-1 expressed on myeloid cells in acute lung injury induced by paraquat in rats], *Zhonghua lao dong wei sheng zhi ye bing za zhi = Zhonghua laodong weisheng*

- zhiyebing zazhi = Chinese journal of industrial hygiene and occupational diseases 33(9) (2015) 646-51.
- [92] C.C. Winterbourn, I.H. Buss, Protein carbonyl measurement by enzyme-linked immunosorbent assay, *Methods in enzymology* 300 (1999) 106-11.
- [93] X. Wang, J. Bai, Q. Xue, X.F. Song, C.M. Qiu, X.C. Li, H.F. Pei, [Tumor necrosis factor- $\alpha$  inhibitor protects against myocardial ischemia/reperfusion injury via Notch1 mediated inhibition of oxidative/nitrative stress in traumatic mice], *Zhonghua xin xue guan bing za zhi* 44(2) (2016) 156-60.
- [94] L.E. Lambert, D.M. Paulnock, Differential induction of activation markers in macrophage cell lines by interferon- $\gamma$ , *Cellular immunology* 120(2) (1989) 401-18.
- [95] E.Y. Choi, H.J. Kim, J.S. Han, Anti-inflammatory effects of calcium citrate in RAW 264.7 cells via suppression of NF- $\kappa$ B activation, *Environmental toxicology and pharmacology* 39(1) (2015) 27-34.
- [96] D.W. Good, T. George, B.A. Watts, 3rd, Toll-like receptor 2 is required for LPS-induced Toll-like receptor 4 signaling and inhibition of ion transport in renal thick ascending limb, *The Journal of biological chemistry* 287(24) (2012) 20208-20.
- [97] H. Huang, C.K. Park, J.Y. Ryu, E.J. Chang, Y. Lee, S.S. Kang, H.H. Kim, Expression profiling of lipopolysaccharide target genes in RAW264.7 cells by oligonucleotide microarray analyses, *Archives of pharmacol research* 29(10) (2006) 890-7.
- [98] H.E. Williams, M. Claybourn, A.R. Green, Investigating the free radical trapping ability of NXY-059, S-PBN and PBN, *Free radical research* 41(9) (2007) 1047-52.
- [99] E. Finkelstein, G.M. Rosen, E.J. Rauckman, J. Paxton, Spin trapping of superoxide, *Molecular pharmacology* 16(2) (1979) 676-85.
- [100] X.A. Wang, R. Zhang, S. Zhang, S. Deng, D. Jiang, J. Zhong, L. Yang, T. Wang, S. Hong, S. Guo, Z.G. She, X.D. Zhang, H. Li, Interferon regulatory factor 7 deficiency prevents diet-induced obesity and insulin resistance, *American journal of physiology. Endocrinology and metabolism* 305(4) (2013) E485-95.
- [101] T. Kawai, S. Akira, The role of pattern-recognition receptors in innate immunity: update on Toll-like receptors, *Nature immunology* 11(5) (2010) 373-84.